

**Enzymsubstitution durch Beladung  
von Erythrozyten als Therapieansatz  
zur Behandlung des Morbus Pompe  
(eine experimentelle Untersuchung  
an Mäusen mit Glucosidasen)**

**Claudia Thannheimer**





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554808\\_0066](https://archive.org/details/IA41554808_0066)



Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. N. Zöllner

Enzymsubstitution durch Beladung von Erythrozyten  
als Therapieansatz zur Behandlung des Morbus Pompe  
(eine experimentelle Untersuchung  
an Mäusen mit Glucosidasen)

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Claudia Thannheimer

München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. U. Srandel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.5.1986

## Inhaltsverzeichnis

|          |                                                                |    |
|----------|----------------------------------------------------------------|----|
| 1.       | Einleitung                                                     | 1  |
| 1.1.     | Glycogenspeicherkrankheiten                                    | 1  |
| 1.2.     | Morbus Pompe                                                   | 2  |
| 1.2.1.   | Die Rolle der $\alpha$ - Glucosidase bei Morbus Pompe          | 2  |
| 2.       | Enzyersatztherapie bei Morbus Pompe                            | 4  |
| 2.1.     | Stand der Forschung                                            | 4  |
| 2.2.     | Aufgabenstellung                                               | 4  |
| 3.       | Versuchsdurchführung                                           | 8  |
| 3.1.     | Material und Methoden                                          | 8  |
| 3.1.1.   | Versuchstiere                                                  | 8  |
| 3.1.2.   | Versuchsanordnung                                              | 10 |
| 3.1.3.   | Präparation der Trägererythrozyten                             | 10 |
| 3.1.4.   | Herstellung des Leberhomogenats                                | 10 |
| 3.1.5.   | Biochemische Analysen                                          | 12 |
| 3.1.5.1. | Abschätzung der erforderlichen Menge an Amyloglucosidase       | 12 |
| 3.1.5.2. | Abschätzung der erforderlichen Menge an $\alpha$ - Glucosidase | 12 |
| 3.1.5.3. | Berechnung der Enzymaktivität                                  | 13 |
| 3.1.5.4. | Auswertung der Meßergebnisse                                   | 16 |
| 3.2.     | Vorversuche                                                    | 18 |
| 3.2.1.   | Material                                                       | 18 |
| 3.2.2.   | Michaelis Menten Beziehung                                     | 18 |
| 3.2.3.   | pH - Optimumkurven der Enzyme                                  | 21 |
| 3.2.4.   | Physikalische Einflüsse auf das Leberhomogenat                 | 23 |
| 3.2.5.   | $\alpha$ - Glucosidase Aktivität der unbehandelten Leber       | 25 |
| 3.3.     | Hauptversuche                                                  | 25 |
| 3.3.1.   | Erster Hauptversuch                                            | 27 |
| 3.3.2.   | Zweiter Hauptversuch                                           | 29 |
| 3.3.3.   | Dritter Hauptversuch                                           | 31 |
| 4.       | Diskussion der Ergebnisse                                      | 33 |
| 4.1.     | Enzymtransportkinetik der Trägererythrozyten                   | 33 |
| 4.2.     | Ergebnisse der Hauptversuche                                   | 35 |
| 4.3.     | Einfluß von Umweltfaktoren                                     | 39 |
| 4.3.1.   | Auswahl der Versuchstiere                                      | 39 |

|        |                                          |    |
|--------|------------------------------------------|----|
| 4.3.2. | Tagesrhythmik der $\alpha$ - Glucosidase | 39 |
| 4.3.3. | Klimatische Einflüsse                    | 40 |
| 4.4.   | Betrachtung der Fehlermöglichkeiten      | 42 |
| 4.5.   | Zusammenfassung                          | 44 |
| 5.     | Tabellen                                 | 46 |
| 6.     | Literaturverzeichnis                     | 75 |

## 1. Einleitung

### 1.1. Glykogenspeicherkrankheiten

Bei den Glykogenosen oder auch Glykogenspeicherkrankheiten handelt es sich um eine Gruppe seltener Erbkrankheiten. Gemeinsames Kennzeichen ist die pathologisch gesteigerte Glykogenspeicherung in Leber, Nieren, Skelett- und Herzmuskulatur, im zentralen Nervensystem und in anderen Körperzellen. Zum Verständnis der biochemisch unterschiedlichen Typen von Glykogenspeicherkrankheiten werden kurz die wichtigsten Reaktionen des normalen Glykogauf- und abbaus dargestellt:

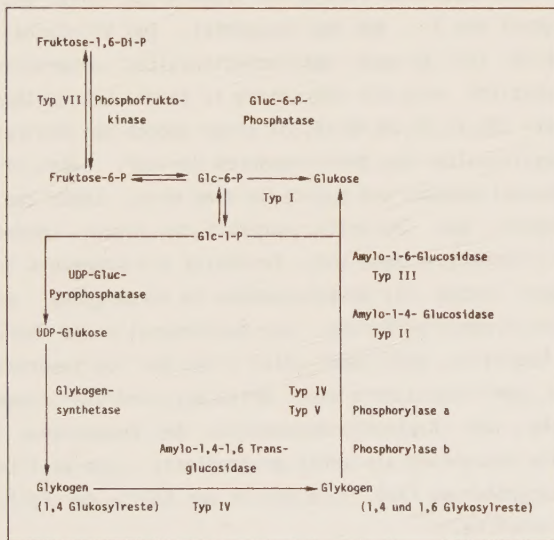


Abb.1: Glykogenstoffwechsel und Glykogenosen

Zu den am häufigsten beobachteten Glykogenosen zählen Morbus Gierke (Typ I), Morbus Pompe (Typ II), Morbus Andersen (Typ IV) und Morbus Mc Ardle (Typ V) (30). Wie aus Abbildung 1 ersichtlich werden aufgrund genetischer Defekte verschiedene Enzyme nicht oder nur fehlerhaft synthetisiert. Daher er-

scheint es wünschenswert, Enzyme in Organen anzureichern, in denen sie ein physiologisches Maß unterschreiten, oder in denen sie gänzlich fehlen. In dieser Arbeit steht die lysosomale  $\alpha$ -Glucosidase, eine saure Maltase, im Mittelpunkt, deren Mangel bei Patienten mit Morbus Pompe festgestellt wurde.

## 1.2. Morbus Pompe

Der Morbus Pompe, auch generalisierte Glykogenose genannt, folgt dem autosomal rezessiven Erbgang und wird mit einer Häufigkeit von 1 : 400 000 beobachtet. Das klinische Krankheitsbild ist je nach Manifestationsalter unterschiedlich. Grundsätzlich wird die Erkrankung in jedem Lebensalter beobachtet (25,26,29,39,55,56,83) zeigt jedoch bei Manifestation im Säuglingsalter den gravierendsten Verlauf. Neben allgemeiner Muskelschwäche und Hypotonie sind Herz, Leber und Zunge vergrößert, der Tod tritt innerhalb des ersten Lebensjahres durch Linksherzversagen ein. Erscheint die Krankheit im Kindesalter, steht die Muskelschwäche im Vordergrund, die aber auch von Organvergrößerung, wie Kardiomegalie und Makroglossie, begleitet sein kann. Hier tritt der Tod innerhalb der ersten zwei Lebensjahre ein, meist aufgrund von Atemmuskelschwäche oder Aspirationspneumonie. Bei Erwachsenen erwies sich die Erkrankung als wenig progredient; man stellte keine Organvergrößerung fest, und nur in der Hälfte der Fälle Atemmuskelschwäche.

### 1.2.1. Die Rolle der $\alpha$ -Glucosidase bei Morbus Pompe

Biochemisch besteht bei den Morbus Pompe Patienten ein Mangel an lysosomaler  $\alpha$ -1-4-Glucosidase in Muskel, Herz und Leber (3,83). Das Enzym greift die 1-4 Verzweigungsstellen mit einer hohen Wechselzahl an und hydrolysiert so Maltose,

lineare Oligosaccharide und die äußeren Verbindungen des Glycogenmoleküls in Glukose. Die 1-6 Verbindungen werden nur langsam gespalten (31,51). Außerdem katalysiert die  $\alpha$ -Glucosidase die Transglycosylation von Maltose in Glycogen. Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen fand man bei Patienten mit Morbus Pompe zwei Lokalisationen des Glycogens: Einmal frei gestreut wie in der normalen Leberzelle, und zum anderen in Vakuolen, die als Lysosomen angesehen werden (3,26,33,35).

## 2. Enzyersatztherapie bei Morbus Pompe

### 2.1. Stand der Forschung

Eine wirksame Therapie des Morbus Pompe gibt es zur Zeit noch nicht. Behandlung mit Vitamin A und C, menschlicher Speichelamylase, Sauerstoffüberdruckbehandlung, Trasylol und Progesteron blieben ohne Erfolg (39). Mit hochwertiger Proteindiät über 12 Monate wurde bei einem Morbus Pompe Patienten der Versuch unternommen, die Muskelfunktion und das Wachstum zu verbessern (69). Nach Proteinverdauung stellt man einen Abfall der zirkulierenden Aminosäuren fest, und kann somit dem Muskelkatabolismus entgegenwirken.

Den ersten Versuch einer Enzyersatztherapie griff Baudhuin 1964 auf (3). Ein an Morbus Pompe erkranktes Kind bekam intramuskulär große Dosen einer aus *Aspergillus niger* gewonnenen  $\alpha$ -Glucosidase. Das Enzym wurde in der Leber aufgenommen, erreichte aber weder Herz noch Muskel. Hug und Schubert (40,41) setzten bei ihren Versuchen ebenfalls eine aus *Aspergillus niger* gewonnene  $\alpha$ -Glucosidase ein, stellten eine Steigerung der Enzymaktivität in der Leber und eine Abnahme der abnormen Lysosomen fest, konnten aber auch keinen klinischen Erfolg verzeichnen. Nach viermonatiger Behandlung eines Patienten mit diesem Enzym verstarb dieser an Immunkomplexnephritis und letztlich Herzversagen. Der Einsatz von gereinigter, aus menschlicher Plazenta gewonnener  $\alpha$ -Glucosidase und aus *Aspergillus niger* gewonnener  $\alpha$ -Glucosidase zeigte ebenfalls eine Aufnahme in der Leber (18, 50).

Es stellte sich die Frage, ob sich die Substitution des fehlenden Enzyms bei der Behandlung angeborener lysosomaler Defekte wirksamer erweisen würde, wenn ein geeigneter, biologisch abbaubarer Träger für das Enzym gefunden würde, um dieses "gerichtet" an den Ort seines Fehlens zu bringen. Damit wären folgende Nachteile einer Behandlung mit purem Enzym ausgeschaltet (61, 62).

1. Das Enzym kann nicht sofort nach seiner Injektion verstoffwechselt werden.
2. Das zur Verfügung stehende Enzym ist oft fremd und kann schwere immunologische Reaktionen hervorrufen.
3. Das Enzym muß an bestimmte Orte gelangen, sodaß ein gerichteter Enzyersatz notwendig wird.

Zunächst boten sich Liposomen als Trägersystem für die  $\alpha$ -Glucosidase an. Deren Aufnahme durch kultivierte Fibroblasten, die von einem Patienten mit Morbus Pompe stammten, untersuchten Roerdink und Mitarbeiter (65). Fast 100% des lipid-eingeschlossenen Enzyms war gebunden. Im Gegensatz zur nicht eingeschlossenen Amyloglucosidase im kultivierten Medium, bei der man nur eine kleine Abnahme des Zellglycogens und Zunahme des intrazellulären Glucosevorrats verzeichnete, zeigte sich bei der lipid-eingeschlossenen  $\alpha$ -Glucosidase nach einer Inkubation von 24 Stunden eine Abnahme des Fibroblastenglycogengehalts um die Hälfte. Ebenfalls mit einer aus *Aspergillus niger* gewonnenen  $\alpha$ -Glucosidase, die in Liposomen eingeschlossen wurde, versuchten Tyrrell und Mitarbeiter (86) die Behandlung eines achtmonatigen moribunden Pompe-Patienten. Über 7 Tage verteilt wurden insgesamt 32 Units Enzym injiziert. Das Ergebnis war eine sichtbare Verkleinerung der Leber schon nach viertägiger Behandlung, was auf eine Abnahme des Leberglycogens hinweist, aber kein klinischer Erfolg. Der Patient verstarb 8 Tage nach Behandlungsbeginn an Herzversagen. Immunologische Reaktionen traten nicht auf.

Mit menschlicher Leber  $\alpha$ -Glucosidase, die an LDL gebunden wurde, untersuchten 1980 Williams und Mitarbeiter (91, 92) deren Aufnahme in Fibroblasten gesunder, an Morbus Pompe erkrankter und an familiärer Hypercholesterinämie leidender Patienten, und stellten bei der gebundenen gegenüber der frei applizierten  $\alpha$ -Glucosidase eine um das zweieinhalbfache gesteigerte Halbwertszeit im Kulturmedium und eine um das dreifache verringerte Empfindlichkeit gegenüber immunologischen Reaktionen fest. Als Therapiemöglichkeit wurde der Lipoprote-

inkomplex dann bei einem 13-monatigen Morbus Pompe Patienten eingesetzt. Im Abstand von 73 Tagen wurden zwei Injektionen gegeben, einmal 20, dann 10 Units Enzym. Von Interesse ist, daß keine Antikörperbildung oder immunologische Reaktion entdeckt werden konnte. Von klinischer Seite jedoch zeigte sich keine Besserung, eventuell ein verzögerter Krankheitsverlauf. In Herz, Leber und Muskel ließ sich nur eine geringe Aufnahme des Enzyms feststellen. Das Einbringen liposomaler anti  $\alpha$ -1-4-Glucosidase Antikörper in Leberlysosomen zeigte eine Abnahme der  $\alpha$ -1-4 Glucosidase Aktivität und des Glycogengehalts (27).

Poznanski und Mitarbeiter (64) setzten bei Ratten Anti-Hepatozyten Antikörper ein, um  $\alpha$ - Glucosidase- Albuminpolymere zu den Hepatozyten im Gegensatz zu den Kupfferzellen zu bringen. Es resultierte eine gesteigerte Aufnahme des Enzym-Albumin-Polymers von den Kupfferzellen zu den Hepatozyten.  $\alpha$ - Glucosidase, die aus Plazenta gewonnen wurde, erwies sich beständiger gegenüber proteolytischem Abbau als die aus Hefe hergestellte  $\alpha$ - Glucosidase. Poznanski konnte mit diesen Versuchen zwar eine Enzymfreisetzung in der Leber nachweisen, doch im Herzmuskel zeigte sich keine Aktivität. Als nächstes setzte er Insulin (63) als Trägersystem für die  $\alpha$ - Glucosidase oder ein Enzym-Albumin-Polymer ein. An Insulin wurde native  $\alpha$ -Glucosidase gebunden. Der Erfolg war, daß Insulin sich mit den Milz- und Muskelzellen mit vierfacher Steigerung verband. Das so verwendete Insulin behielt seine biologische Aktivität und beinhaltete noch die Bindungsstellen für Anti-Insulin-Antikörper.

Als ein weiteres Trägersystem für das zu substituierende Enzym bei der Behandlung angeborener Stoffwechselleiden betrachtete man patienteneigene Erythrozyten (71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79) als erfolgsversprechend. Es wurde eine Methode entwickelt, Erythrozyten durch osmotische Dialyse so zu beladen, daß diese sich von normalen Erythrozyten nicht wesentlich unterschieden. Die Vorteile dieser Methode beruhen auf der längeren Verweildauer des Trägersystems im Körper gegenüber frei appliziertem Enzym, dem Ausschluß immunologischer Reaktionen und auf der Möglichkeit, das Enzym im Organismus sicher

an den Ort des toxisch angehäuften Metaboliten zu bringen.

## 2.2. Aufgabenstellung

Angewandt auf die Problematik des Morbus Pompe, der Glycogenose Typ II, stellt sich nun die Frage, inwieweit Tierversuche als Aussage über Therapiemöglichkeiten menschlicher genetischer Defekte herangezogen werden können (10, 11, 36). In der Literatur (10, 11, 36) wurde bisher kein Mäusestamm dieses Defekts beschrieben, nur spontan aufgetretene Glycogenspeicherkrankheiten konnten nachgewiesen werden (88).

In dieser Arbeit wurden gesunde Mäuse verwendet und deren Stoffwechsel durch Zugabe der bei Morbus Pompe fehlenden  $\alpha$ -Glucosidase beeinflußt. Die Übertragbarkeit der Meßergebnisse auf den menschlichen Organismus ist nicht Gegenstand dieser Arbeit, da es zunächst zu untersuchen gilt, in welcher Weise eine möglichst effektive Anreicherung des fehlenden Enzyms möglich ist.

Es stellte sich nun die Aufgabe, die oben beschriebenen Erythrozytenträger auf den Transport der  $\alpha$ -Glucosidase zu untersuchen. Die Anreicherung des Enzyms im Erfolgsorgan Leber ist somit ein Kriterium für die Effektivität therapeutischer Maßnahmen. Der Enzymkonzentration aufgrund beladener Erythrozyten wird diejenige Konzentration gegenübergestellt, die durch Substitution von freiem Enzym erreicht wird.

### 3. Versuchsdurchführung

#### 3.1. Material und Methoden

In dieser Arbeit wird mit Mäusen als Versuchstieren gearbeitet, die rein zufällig in drei Gruppen aufgeteilt wurden. Der ersten Gruppe wurde freies Enzym, der zweiten in Trägererythrozyten eingeschlossenes Enzym injiziert. Eine dritte Gruppe diente als Kontrollgruppe, das heißt, diesen Mäusen wurde NaCl gespritzt. Nach genau definierten Zeitabschnitten wurde der  $\alpha$ -Glucosidasegehalt der Leber bestimmt.

##### 3.1.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden mit etwa 8 - 12 Wochen alten, männlichen, weißen NMRI - Mäusen durchgeführt, deren Körpergewicht etwa 35 g und Lebergewicht 1.7 g durchschnittlich betrug. Als Hauptkriterium für die Auswahl der Maus als Versuchstier galt die geeignete Präparation der Erythrozyten zu Trägererythrozyten (72, 76, 78). Die Maus erwies sich neben Hund und Affe, - Ratten, Kaninchen und Guineaschweine mußten wegen Nichtpräparierbarkeit der Erythrozyten ausgeschlossen werden - wegen ihrer Größe als geeignetes Versuchstier (72, 76, 78). Weitere Vorteile waren die geringen Anschaffungskosten bei einer großen Anzahl von Versuchstieren, die kostengünstige, platzsparende und vorallem leichte Pflege und Unterbringung in einem kleinen Labor. Bei der Versuchsvorbereitung mußte darauf geachtet werden, daß die für einen Versuchstag benötigte Anzahl von Mäusen gleichzeitig in einem Käfig untergebracht wurden.

##### 3.1.2. Versuchsanordnung

Die drei Hauptversuche unterscheiden sich in dem gespritzten Enzym, der Anzahl der Versuchstiere und in der Anordnung der

Versuchstage, da die Erfahrungen vorangegangener Versuche in die jeweils folgenden eingebracht wurden. Die hier beschriebene Versuchsanordnung stellt exemplarisch den dritten Hauptversuch dar. Zur Versuchsvorbereitung gehörte die Aufteilung der Mäuse zu je 15 Stück pro Käfig pro Versuchstag und die Herstellung der Trägererythrozyten (3.1.3.). Am ersten Versuchstag wurde den für die ganze Versuchsreihe benötigten Mäusen das jeweilige Substrat (siehe Abb.2) in die lateralen Schwanzvenen gespritzt.

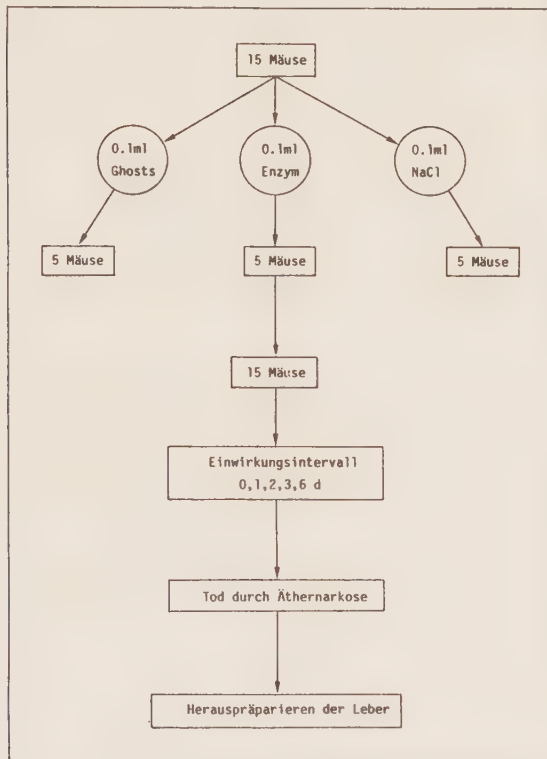


Abb.2: Versuchsablauf (exemplarisch 3. Hauptversuch)

Die drei Gruppen pro Käfig erhielten Farbmarkierungen. Nach dem jeweiligen Zeitintervall wurden die Mäuse, zur gleichen Tageszeit, zu der die Injektion erfolgte, durch Äthernarkose

getötet, die Leber sorgfältig herauspräpariert, und die Enzymaktivität gemessen. Anstelle des in vivo maßgeblichen Glykogens (siehe 1.2.1.) wird in dieser Arbeit der Aktivitätsnachweis mit dem ebenfalls aus 1-4 Bindungen aufgebauten Maltosemoleküls erbracht.

### 3.1.3. Präparation der Trägererythrozyten

Da die Mäuse alle dem gleichen Stamm angehörten und somit die gleiche Blutgruppe hatten, konnten immunologische Reaktionen nach der Reinjektion ausgeschlossen werden. Blut wurde frisch gesammelt und mit Heparin als Antikoagulans versetzt (500 USPE/ml Blut). Mittels einer Methode der hypoosmotischen Dialyse wurden die Erythrozytenschatten mit der  $\alpha$ -Glucosidase beladen und durch nachfolgende Dialyse wieder verschlossen (81,82). Das zweimalige Waschen des Blutes (1100g/10min) erfolgte in Puffer I (0.15M NaCl/ 5mM  $K_2HPO_4$ , pH 7.4) bei 4°C. Anschließend wurden die Erythrozyten (4 Volumina) mit Puffer I, der das Enzym erhielt (1 Volumen), zusammengegeben. Beide Enden des Dialysesäckchens wurden an einem Glasstab befestigt und in ein Gefäß gegeben, das mit hypoosmolarem Puffer II (5mM  $K_2HPO_4$ /  $KH_2PO_4$ , pH 4) gefüllt war. Das Gemisch wurde 75 Minuten bei 4° C rotiert. Es folgte die Dialyse gegen den isoosmotischen Puffer I (angereichert mit 1mM Glukose, 5mM Adenosin, 1 $\mu$ M MgCl) für 45 Minuten bei 37°C. Durch Einlagerung der Erythrozyten über 12 Stunden in dem angereicherten Puffer I konnte die Stabilität der Erythrozyten weiter erhöht werden.

### 3.1.4. Herstellung eines Leberhomogenats

Die der Maus entnommene Leber wurde unmittelbar nach der Präparation eingefroren (siehe Abb.3), um jede Leber für die gleichzeitige Weiterverarbeitung zu konservieren, und lebereigene Abbauvorgänge möglichst geringzuhalten. Um die Viskosität des Homogenats in einen pipettierfähigen Bereich zu bringen

und zur Stabilisierung wurde ein Puffer zugesetzt. Die mechanische Zerkleinerung erfolgte mit dem Ultraturrax (nach Prof. Willems, TP 18-10, 20000 UpM, 170 W, Fa. Janke und Kunkel), da die versuchsweise durchgeführte Ultraschallzerkleinerung mit dem Sonifier-B-12 (Branson Sonic Power Company) durch die übermäßige Wärmeentwicklung das Enzym nachweislich inaktivierte.

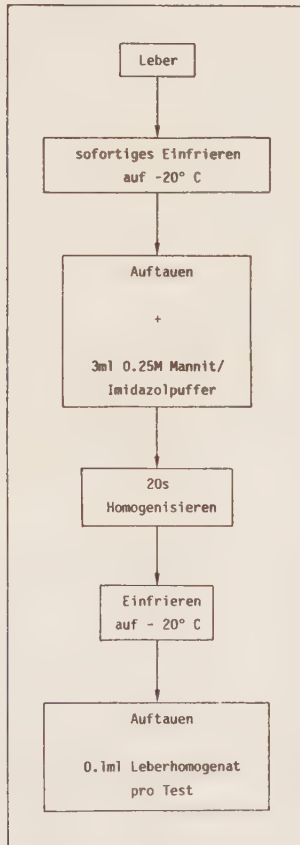


Abb.3: Einzelschritte der Leberhomogenisierung

### 3.1.5. Biochemische Analysen

#### 3.1.5.1. Abschätzung der erforderlichen Menge an Amyloglucosidase

Bei einem durchschnittlichen Lebergewicht von 2g und einem durchschnittlichen Glykogengehalt von 25mg/g Leber wird in erster Näherung von 50g verwertbarem Glykogen pro Maus ausgegangen. Unter Berücksichtigung des mittleren Molekulargewichtes von Glykogen (zwischen  $10^6$  und  $1.6 \times 10^7$  (31)) und der vom Hersteller für die eingesetzte Amylo 1-4, 1-6 Glucosidase angegebenen Aktivität von 140 U/ml Enzym, die sich auf  $\mu$ mol freigesetzte Glukoseeinheiten pro Minute bezieht, wurde in Hauptversuch I eine Aktivität von 0.5 U/Maus angesetzt, um den Substratumsatz in einem zeitlich kontrollierbaren Intervall erfolgen zu lassen. Sofern kein neues Glykogen nachgebildet werden würde, setzt also die berechnete Enzymmenge das in der Durchschnittsleber enthaltene Glykogen innerhalb 24 Stunden um. Da bei der Herstellung der Trägererythrozyten nur etwa ein Drittel des dem Erythrozytenkonzentrat zugegebenen Enzyms im Dialyseverfahren aufgenommen wird, mußte hier die Enzymkonzentration auf 1.5 U/Maus erhöht werden.

#### 3.1.5.2. Abschätzung der erforderlichen Menge an $\alpha$ -Glucosidase

Die Berechnung der  $\alpha$ -Glucosidase basierte auf den gleichen Gesichtspunkten wie die der Amyloglucosidase. Wie bei den Vorversuchen gezeigt werden konnte, hatte die 1-4  $\alpha$ -Glucosidase eine Aktivität von 195 U/ml. Im Hauptversuch II wurden 0.5 U pro Maus für frei injiziertes Enzym und die dreifache Menge zur Herstellung der Trägererythrozyten verwendet. Eine Verdoppelung der Enzymmenge stellte den dritten Hauptversuch dar. Gleichzeitig zur  $\alpha$ -Glucosidase wurde bei den letzten beiden Versuchen eine  $\beta$ -Glucosidase

gespritzt, jeweils in den gleichen Mengeneinheiten. Durch die Anwendung der  $\beta$ -Glucosidase zusätzlich zur  $\alpha$ -Glucosidase sollte die Hydrolyse des Glykogens vervollständigt und beschleunigt werden (51).

### 3.1.5.3. Berechnung der Enzymaktivität

Die Aktivität der  $\alpha$ 1-4 Glucosidase wurde mit Maltose als Substrat gemessen. Das Maltosemolekül setzt sich aus zwei Glukosemolekülen zusammen, die über eine  $\alpha$ 1-4 glykosidische Bindung aneinandergeknüpft sind.



Die Testansätze bestanden, wie aus Abbildung 4 ersichtlich, aus 4 Reagenzgläsern, wobei die Enzymaktivität der mit Maltose inkubierten Proben und der Leerwerte, d. h. ohne Maltose zur Bestimmung der Eigenaktivität des Lebergewebes, jeweils in zwei Ansätzen bestimmt wurde.

Proben und Puffer, sowie Maltose wurden in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt, um unnötige Fehlerquellen zu vermeiden. Die Zugabe von Maltose nach Inaktivierung des Enzyms bei der Bestimmung der Leerwerte war erforderlich, um eine vergleichbare Zusammensetzung der Ansätze bei der anschließenden photometrischen Bestimmung zu realisieren. Diese wurde mit dem Glukose Hexokinase Test, Nr. 124346 Boehringer Mannheim GmbH durchgeführt. Über Gleichung 1 kann aus der gemessenen Glukose auf die verbrauchte Menge Maltose und damit über die spezifische Aktivität des Enzyms nach Abzug des Leerwertes auf die Gesamtmenge der substituierten  $\alpha$ -Glucosidase geschlossen werden, die im Testansatz vorhanden war.

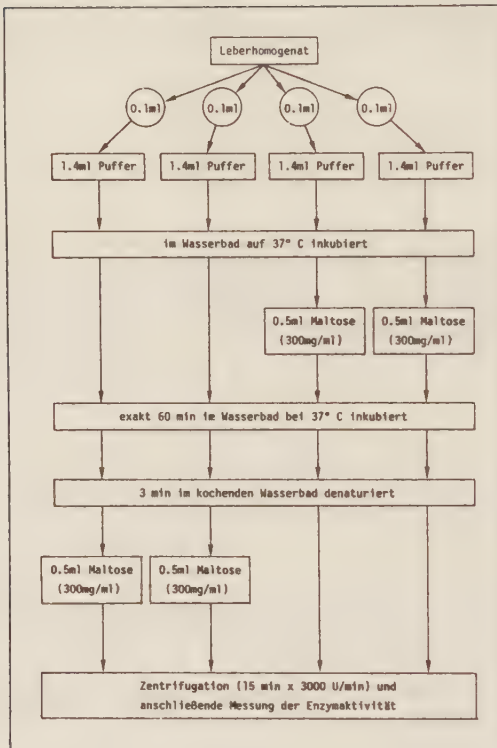
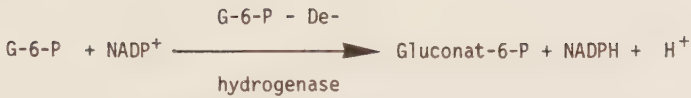


Abb.4: Bestimmung der Enzymaktivität

Die Glukosebestimmung wurde enzymatisch durchgeführt. Nach dem Prinzip der enzymatischen Messung einer Substratkonzentration wird Glukose in einer gekoppelten Reaktion bestimmt.





(Gleichung 3)

In einer Hilfsreaktion wird Glukose durch Hexokinase phosphoryliert und das gebildete Glukose-6-Phosphat in der nachfolgenden Indikatorreaktion durch Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase dehydriert. Die gebildete Menge NADPH, die aus der Extinktionszunahme bei 365 nm errechnet wird, entspricht stöchiometrisch der umgesetzten Glukosemenge.

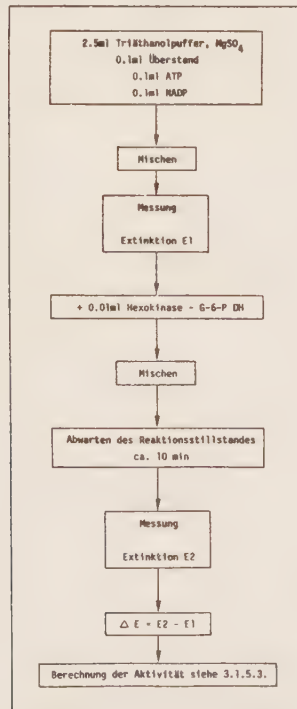


Abb.5: Maltosebestimmung

#### 3.1.5.4. Auswertung der Meßergebnisse

Die Konzentration der Glukose in der Meßlösung errechnet sich nach ( Bergmeyer 1974 ):

$$c_{\text{NADPH}} = \frac{\Delta E}{\epsilon_{\mu\text{mol}} \times d} \quad ( \mu\text{mol/ml Meßlösung} )$$

( Gleichung 4 )

E = Extinktion (-)

d = Schichtdicke ( cm )

$\epsilon$  = mikromolarer Extinktionskoeffizient (  $\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$  )

Nach 3.1.5.2. folgt aus Gleichung 3 :

$$c_{\text{NADPH}} = c_{\text{Glukose}}$$

( Gleichung 5 )

Mit Gleichung 1 folgt :

$$c_{\text{Glukose}} = 0.5 \times c_{\text{Maltose}}$$

( Gleichung 6 )

und die Menge der umgesetzten Maltose zu :

$$N_{\text{Maltose}} = 2 \times c_{\text{Glukose}} \times V \quad ( \text{mol} )$$

( Gleichung 7 )

V = Volumen der im photometrischen Test eingesetzten Lösung (ml).

Die Enzymaktivität errechnet sich dann aus Gleichung 8 :

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{N}{t} \quad ( U \text{ oder } \mu\text{mol/min} )$$

Eine internationale Einheit ( U ) ist diejenige Enzymaktivität, die pro Minute unter definierten Bedingungen die Umwandlung von einem Mikromol Substrat katalysiert. Unter definierten Bedingungen versteht man optimale Temperatur, optimaler pH, Puffersystem, Konzentration und Kofaktoren.

## 3.2. Vorversuche

### 3.2.1. Material

Für sämtliche Versuche wurden folgende Reagentien benötigt:

- Amyloglucosidase, Boehringer, Best.Nr. 102857
- $\alpha$ - Glucosidase, Sigma, Best.Nr. G 7256
- $\beta$ - Glucosidase, Sigma, Best.Nr. G 8625
- Maltose, Sigma, Best.Nr. M 5885
- Puffer für den jeweiligen pH - Bereich:  
(Molarität immer 5 mmol)
  - pH 3 - 3.5 : Milchsäure-NaOH Puffer
  - pH 4 - 5.5 : Essigsäure-Natriumacetat Puffer
  - pH 6 - 6.5 : Na-Kakodylat-Salzsäure Puffer
  - pH 7 - 8 : Imidazol-Salzsäure Puffer
  - pH 8.5 : Glycylglycin-NaOH Puffer
  - pH 9 - 9.5 : Glycin-NaOH Puffer.

### 3.2.2. Michaelis Menten Beziehung

Bei der Berechnung der Enzymaktivität ist darauf zu achten, daß Substratsättigung vorliegt, da nur dann die Reaktionsgeschwindigkeit  $v = v_{\max}$ , und damit substrat-unabhängig ist. In den Hauptversuchen wird daher angestrebt, die Substratmenge so zu bemessen, daß für die substituierten Enzymmengen Substratsättigung vorliegt. Sofern keine Eigenaktivität des Lebergewebes vorliegen würde, wäre damit die Substratsättigung im Lebergewebe garantiert; da es sich bei der Substitution jedoch um eine Anreicherung der  $\alpha$ - Glucosidase handelt, muß mit einer unbekannten Eigenaktivität des Lebergewebes gerechnet werden (3.2.4.), weshalb die Substratsättigung nicht vorausgesetzt werden kann. Aus Diagramm 1, das die graphischen Zusammenhänge des Lineweaver - Burk Diagrammes wiedergibt, läßt sich jedoch die Maximalgeschwindigkeit  $v_{\max}$  bei Substratsättigung berechnen, auch wenn diese bei den Versuchen nicht vorgelegen hat, sofern die Michaeliskonstante des

Diagramm 1

Graphische Ermittlung der Michaeliskonstanten der  $\alpha$ -Glucosidase im Lineweaver-Burk Diagramm bei unterschiedlicher Maltosekonzentration und gleicher Enzymkonzentration (0.0025 ml  $\alpha$ -Glucosidase/ ml Lösung)

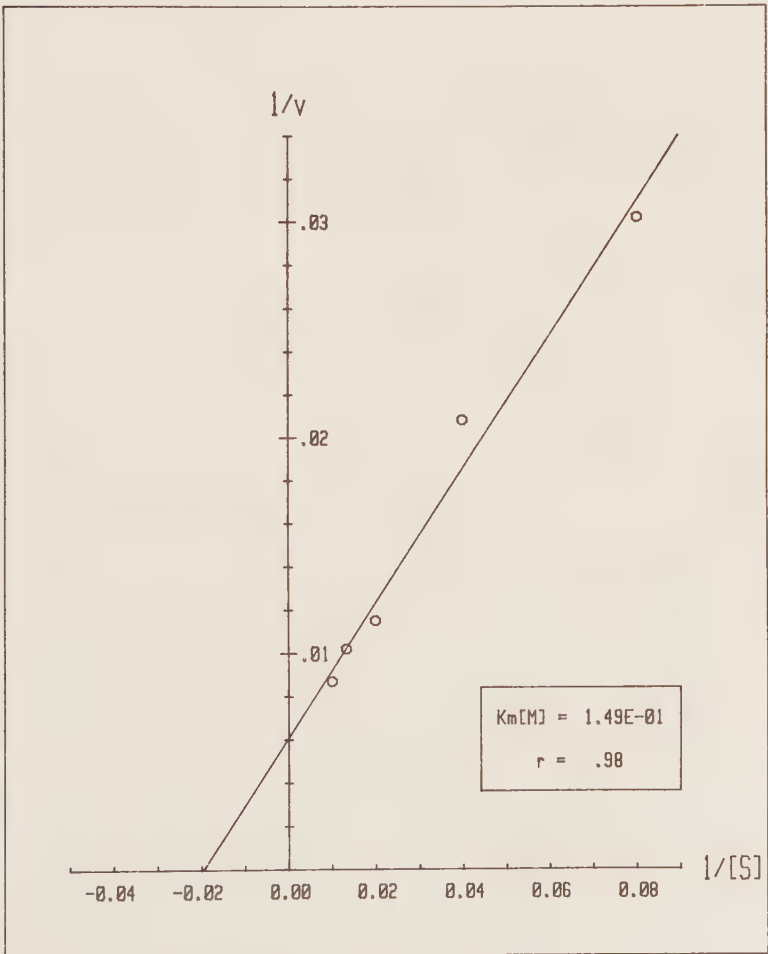
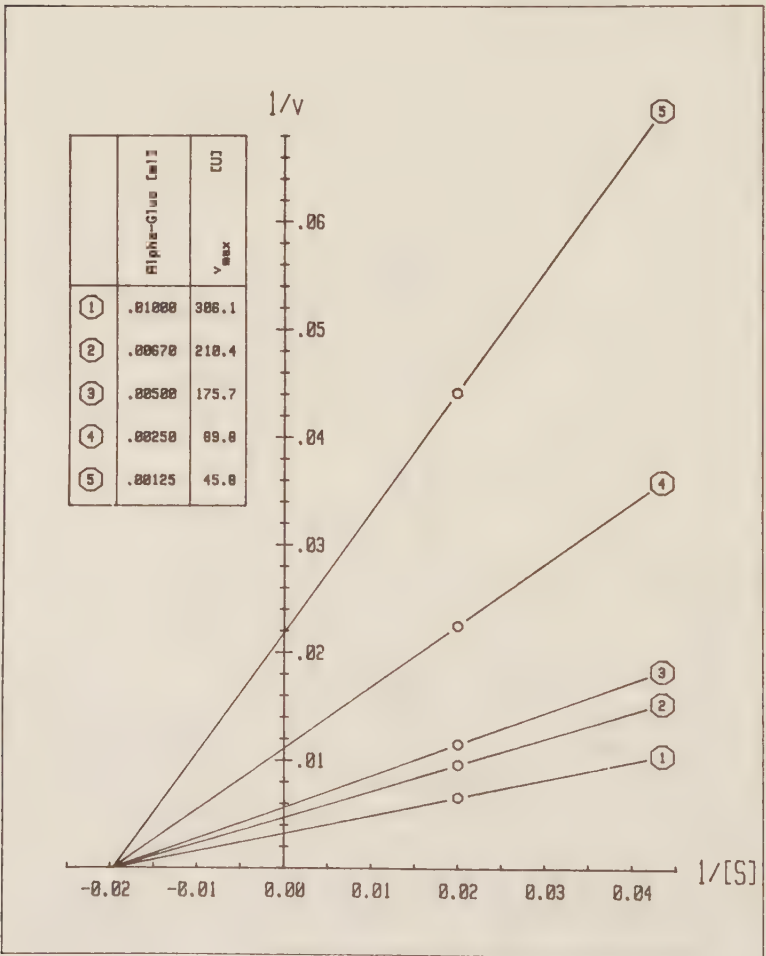


Diagramm 2

Graphische Berechnung von  $v_{\max}$  bei bekannter Michaeliskonstante, verschiedener  $\alpha$ - Glucosidasekonzentration und konstanter Maltosekonzentration (50 mg Maltose/ ml Testansatz)



verwendeten Enzyms bekannt ist. Tabelle 1 gibt die Meßreihen wieder, mit denen die Michaeliskonstante der  $\alpha$ - Glucosidase in Diagramm 1 graphisch ermittelt wurde. Die wiedergegebenen Regressionsgeraden aus jeweils 3 bis 6 Meßpunkten wurden nach der Methode der kleinsten quadratischen Abweichung mit einem Rechner ermittelt. Für die Michaeliskonstante ergab sich folgender Wert:

$$k_m (\alpha\text{- Glucosidase}) = 1.49 \times 10^{-1} \text{ Mol/l.}$$

Mit der aus Diagramm 1 berechneten Michaeliskonstanten  $k_m$  läßt sich  $v_{\max}$  bei verschiedenen  $\alpha$ - Glucosidasekonzentrationen und bekannter Maltosekonzentration wie aus Diagramm 2 und Tabelle 2 ersichtlich berechnen:

$$v_{\max} = v_{\text{gemessen}} \times \frac{k_m}{S} + 1 .$$

### 3.2.3. pH-Optimumkurven der eingesetzten Enzyme

Bestimmt man die Aktivität eines Enzyms bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration, so erhält man beim Auftragen der Enzymaktivität über dem pH-Wert einen stetigen Verlauf mit einem charakteristischen Maximum. Der pH-Wert, der der maximalen Enzymaktivität entspricht, wird als das pH-Optimum der entsprechenden Enzymreaktion bezeichnet. pH-Optimumskurven wurden für die  $\alpha$ - Glucosidase (Sigma Nr. G 7256) und die Amyloglucosidase (Boehringer Nr. 102857) erstellt. Die Versuche wurden jeweils bei einer konstanten Temperatur von 25° C und einer Maltosekonzentration von 250 mg/ml durchgeführt. Die Ergebnisse der Meßreihen finden sich in den Tabellen 3 und 4. Die graphischen Darstellungen in den Diagrammen 3 und 4 zeigen die Ergebnisse der Meßreihen und die Annäherung durch ein reziprokes Polynom dritten Grades. Durch Berechnung der ersten Ableitung wurde das Kurvenmaximum der  $\alpha$ - Glucosidase bei einem

Diagramm 3

pH-Optimumkurve der  $\alpha$ -Glucosidase

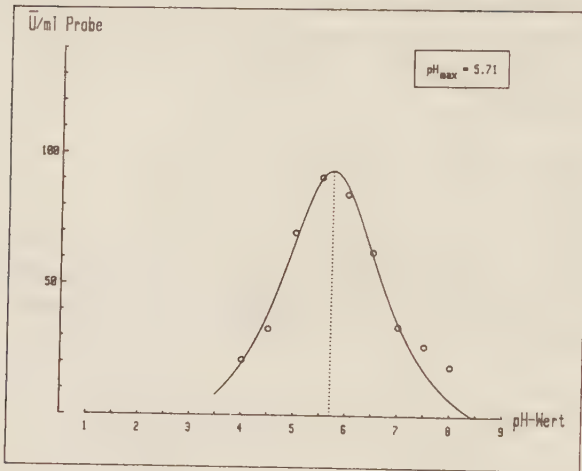
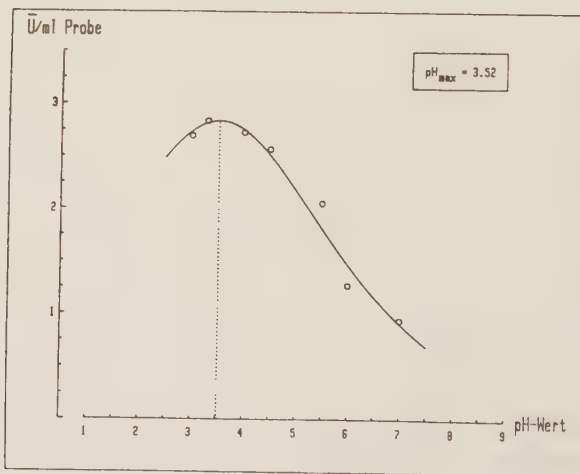


Diagramm 4

pH-Optimumkurve der Amyloglucosidase



pH-Wert von 5,7, und der Amyloglucosidase bei einem pH-Wert von 3,52 ermittelt. Spätere Messungen mit Leberhomogenat stützten sich auf die errechneten pH-Optima.

#### 3.2.4. Physikalische Einflüsse auf das Leberhomogenat

Folgende vier Vorversuche zeigen, inwieweit das Leberhomogenat äußeren Einflüssen wie Einfrieren, Auftauen, Sofortverarbeiten unterworfen ist. Eine Mäuseleber wurde in 16 Stücke pro Leberlappen zerkleinert, diese gemischt und in acht Gruppen aufgeteilt. Die genaue Anordnung ist aus Abbildung 6 ersichtlich. In der ersten Versuchsreihe M I erfolgte die Bestimmung an der sofort nach Entnahme frisch homogenisierten Leber, ohne daß diese zwischenzeitlich eingefroren wurde. Die zweite Meßreihe M II sollte den Einfluß der Tiefkühlung zeigen. Auch hier wurde die Leber frisch homogenisiert, dann aber eingefroren und erst kurz vor Bestimmung wieder aufgetaut. Beim dritten Versuch M III wurde die Leber sofort nach Entnahme eingefroren, mit Zusatz von Puffer aufgetaut, dann homogenisiert, und danach der  $\alpha$ -Glucosidasegehalt bestimmt. In der vierten Meßreihe M IV wurde die gewogene Leber unbehandelt eingefroren, unter Zusatz von Puffer aufgetaut und homogenisiert, abermals eingefroren und nach Auftauen der Bestimmung zugeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Anhand dieser Versuche konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der  $\alpha$ -Glucosidase sich als höher erwies, wenn die Leber sofort eingefroren wurde. Ein zweites Einfrieren nach Homogenisierung zeigte keinen Aktivitätsverlust (34, 22, 52). Bei allen sich anschließenden Versuchen wurde die Bestimmung wie bei M IV durchgeführt.

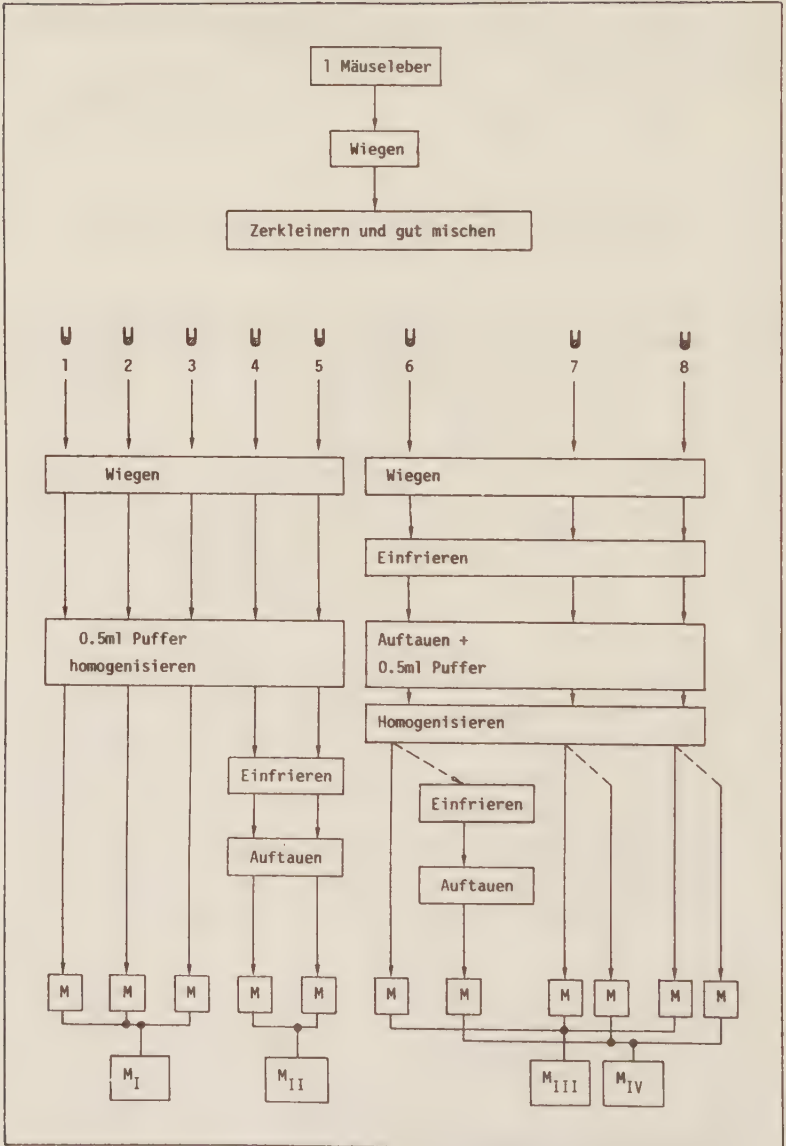


Abbildung 6: Versuchsanordnung

### 3.2.5. $\alpha$ - Glucosidase Aktivität der unbehandelten Leber

Zur Feststellung der  $\alpha$ - Glucosidaseaktivität des unbehandelten Leberhomogenats wurden 5 Mäuse benötigt, deren Leberhomogenat bei den pH-Werten 3.3, 5 und 6 gemessen wurde. Der pH-Wert von 3.3 wurde gewählt, da hier das pH-Optimum der im Hauptversuch 1 verwendeten Amyloglucosidase lag; die Werte bei pH 5 und 6 stellen das pH-Optimum der  $\alpha$ - Glucosidase dar, die im Hauptversuch 2 und 3 eingesetzt wurde. Aus Tabelle 6 werden die Mittelwerte der bei den verschiedenen pH-Werten gemessenen Aktivitäten der Glucosidasen ersichtlich.

### 3.3. Hauptversuche

Die nachfolgenden Hauptversuche weisen gemeinsam den unter Punkt 3.1.2. dargestellten Ablauf vor, unterscheiden sich aber bezüglich der gespritzten Enzymart, der Einwirkdauer, und der Anzahl und Aufteilung der Versuchstiere. Die Messung der Enzymaktivität wird unter Punkt 3.1.4. und 3.1.5.3. erläutert.

Zur Auftragung gelangten jeweils die Mittelwerte einer Versuchsgruppe (gleiche Versuchsbedingungen) abzüglich der Mittelwerte der parallel laufenden, mit NaCl behandelten Kontrollgruppe. Als Bezugsgröße der Ordinate wurde einmal das Lebergewicht und zum anderen das Körpergewicht der Versuchstiere gewählt.

Wie Diagramm 5 zeigt, läßt sich keine Korrelation zwischen diesen beiden Größen erkennen, sodaß beide Werte der Diskussion zur Verfügung stehen sollten.

Die jeweils obere Darstellung in den Diagrammen 6-11 gibt dabei deutlicher den Verlauf der Enzymaktivität über der Zeit an, während die untere Darstellung anschaulich die Relation von frei injiziertem Enzym zu dem in Trägererythrozyten einge-

schlossenen Enzym wiedergibt.

Der Ablauf der drei Hauptversuche war prinzipiell gleich. Zum Zeitpunkt  $t=0$  bekam eine Gruppe der Versuchstiere freies Enzym, eine weitere Gruppe in Trägererythrozyten eingeschlossenes Enzym, und eine dritte Gruppe NaCl verabreicht. Die Besonderheiten der einzelnen Versuche und

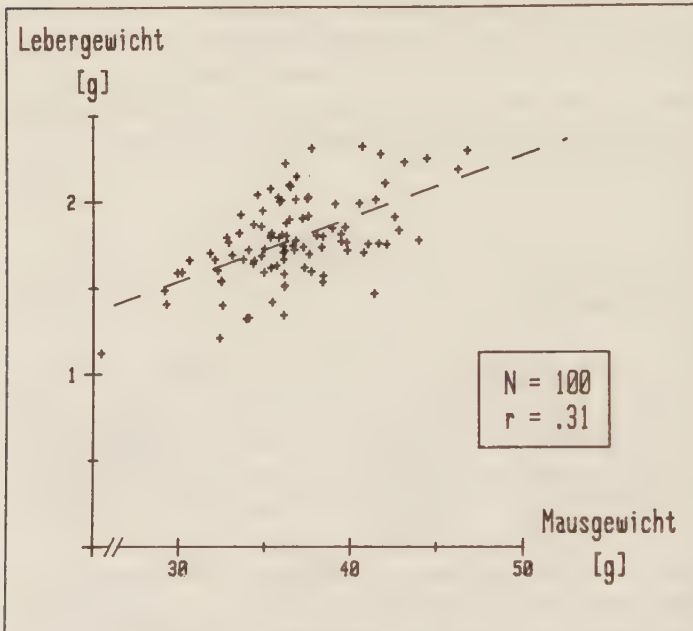


Diagramm 5: Abhängigkeit des Lebergewichtes vom Körpergewicht der Versuchstiere

deren Ergebnisse werden im folgenden dargestellt. Die Aufteilung der Mäuse zu den einzelnen Versuchen wird aus dem Tabellenteil ersichtlich.

### 3.3.1. Erster Hauptversuch

Übersicht: Anzahl der Versuchstiere: 39

Enzym: Amyloglucosidase (Boehringer 102857)

Einwirkungsdauer: 2, 24, 48, 144 Stunden

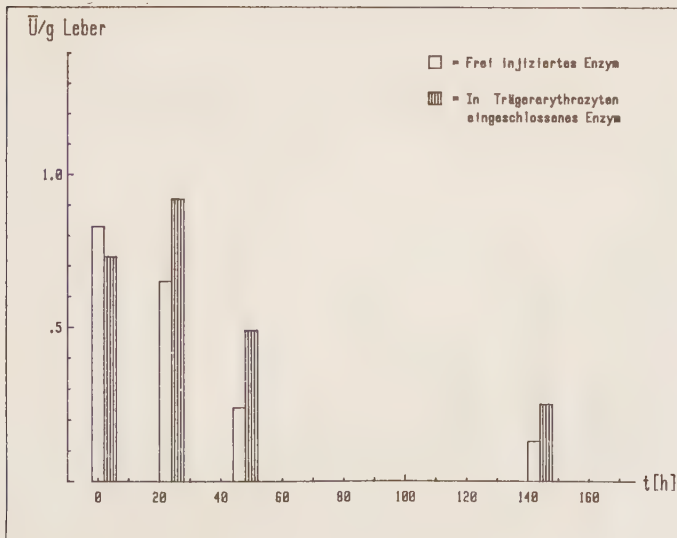
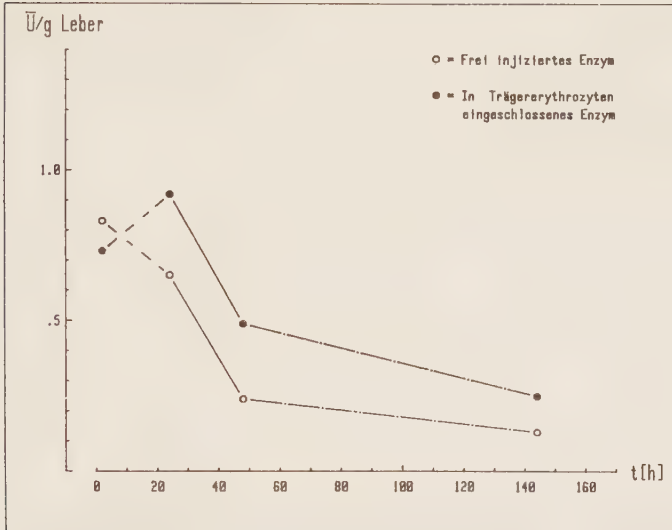


Diagramm 6

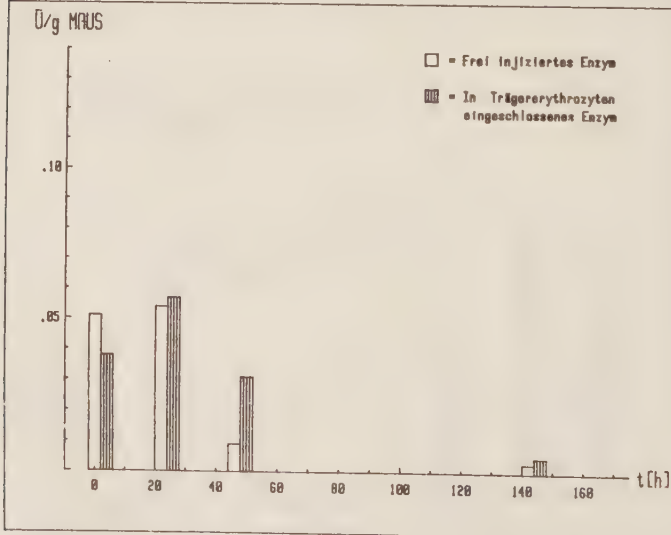
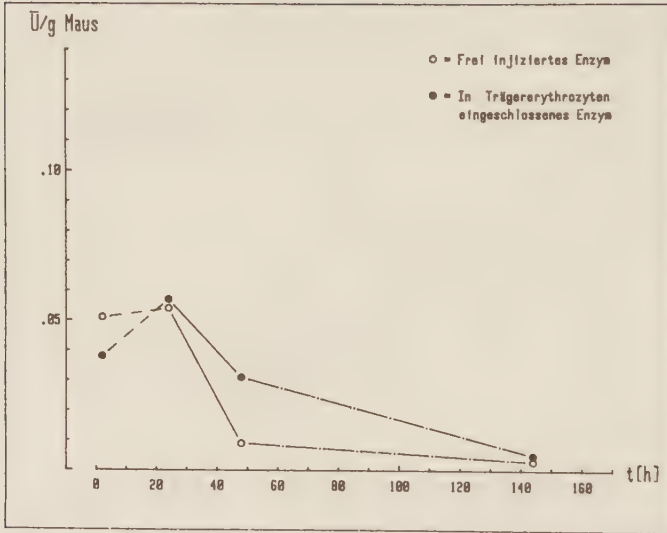


Diagramm 7

### 3.3.2. Zweiter Hauptversuch

Übersicht: Anzahl der Versuchstiere: 39

Enzym:  $\alpha$ - Glucosidase (Sigma Nr. G 7256)

Einwirkungsdauer: 2, 24, 48, 168 Stunden

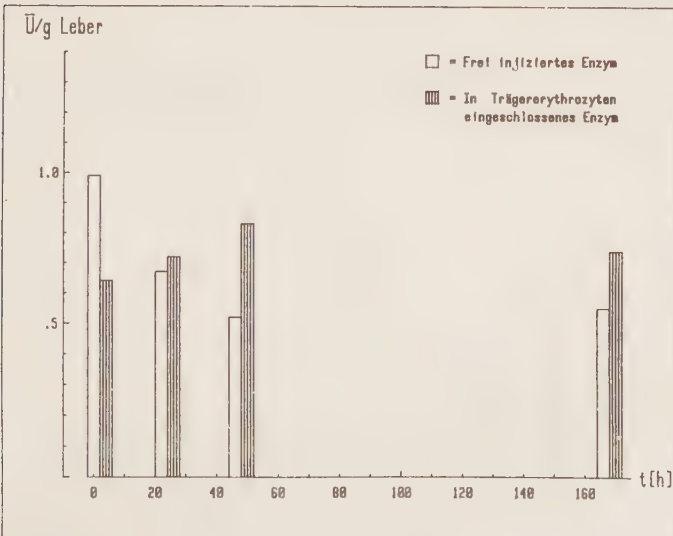
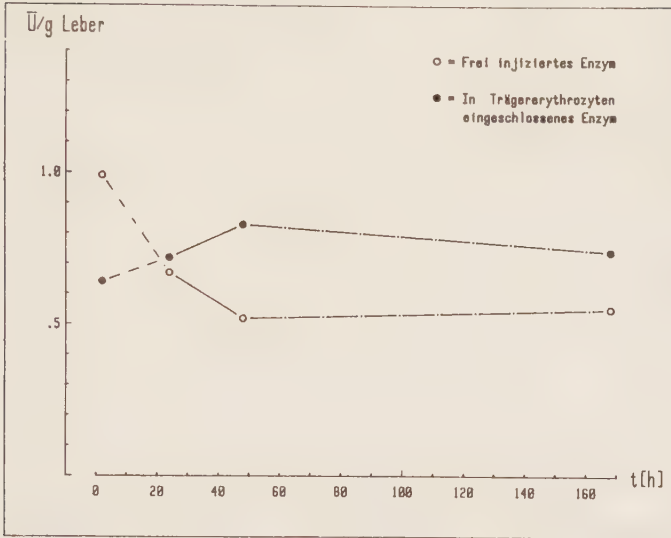


Diagramm 8

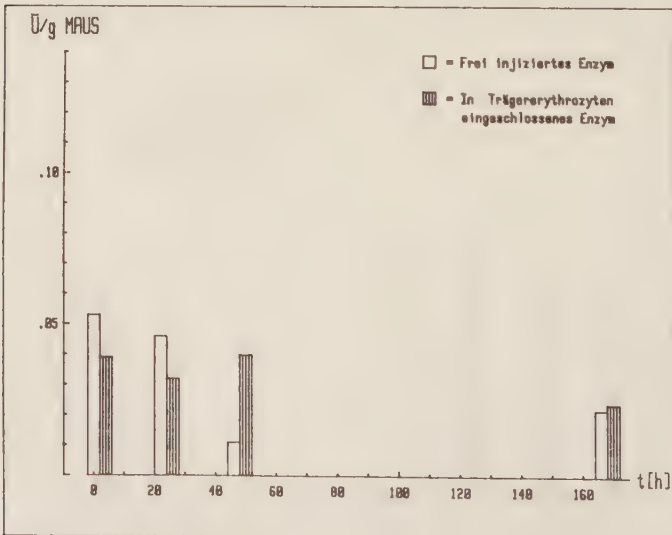
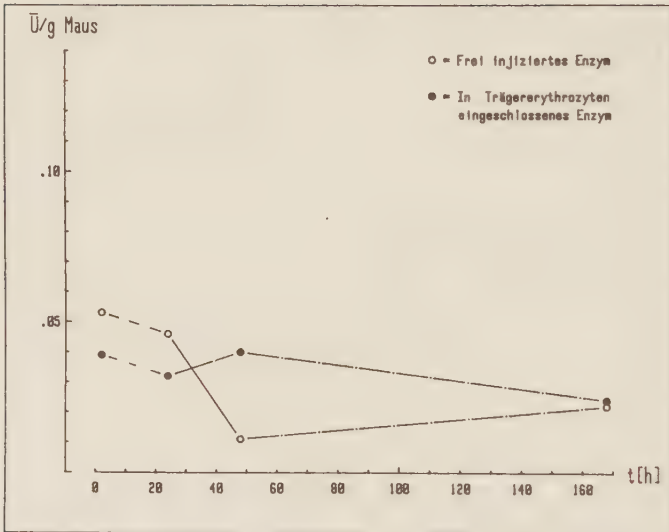


Diagramm 9

### 3.3.3. Dritter Hauptversuch

Übersicht: Anzahl der Versuchstiere: 75

Enzym:  $\alpha$ -Glucosidase (Sigma Nr. G 7256)

Einwirkungsdauer: 2, 24, 48, 72, 144 Stunden

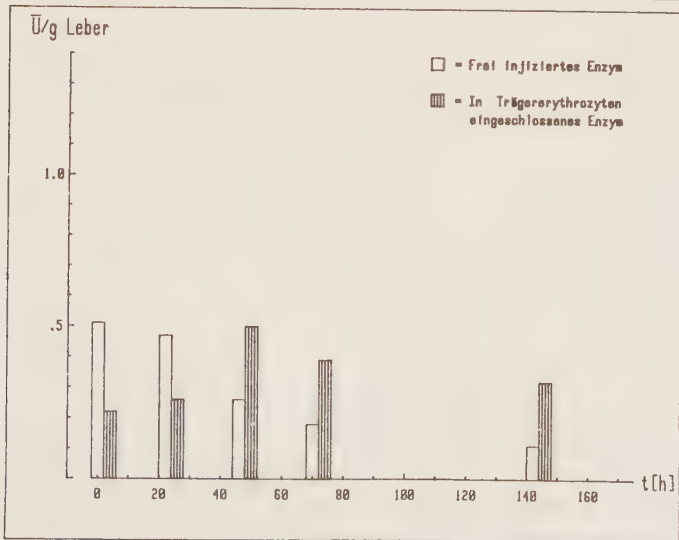
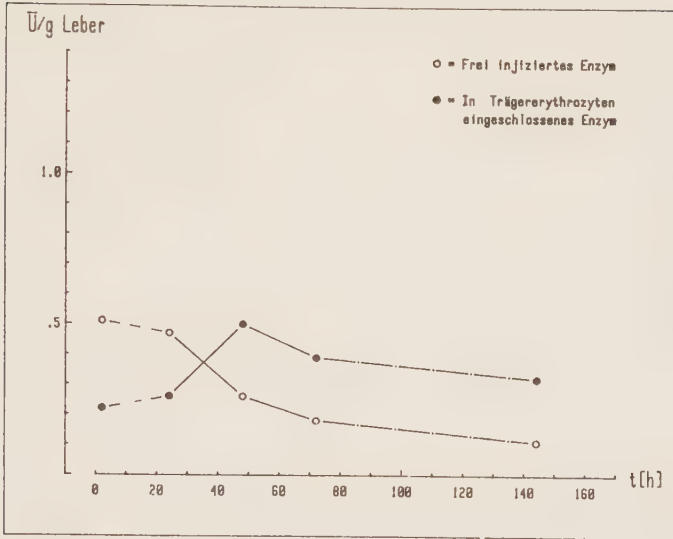


Diagramm 10

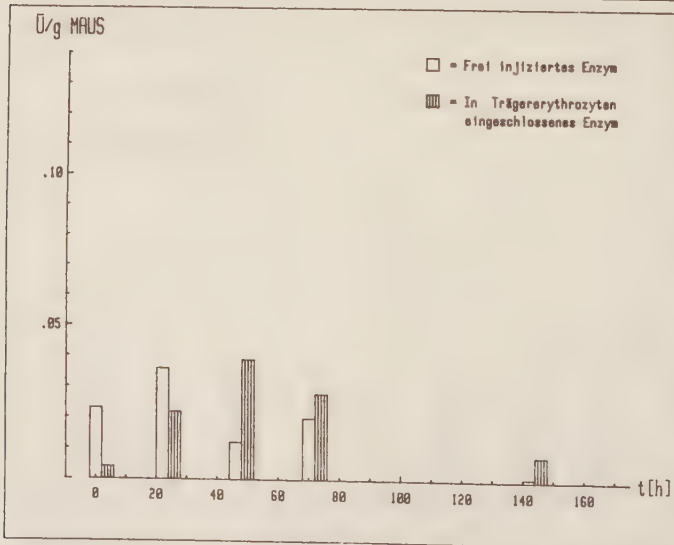
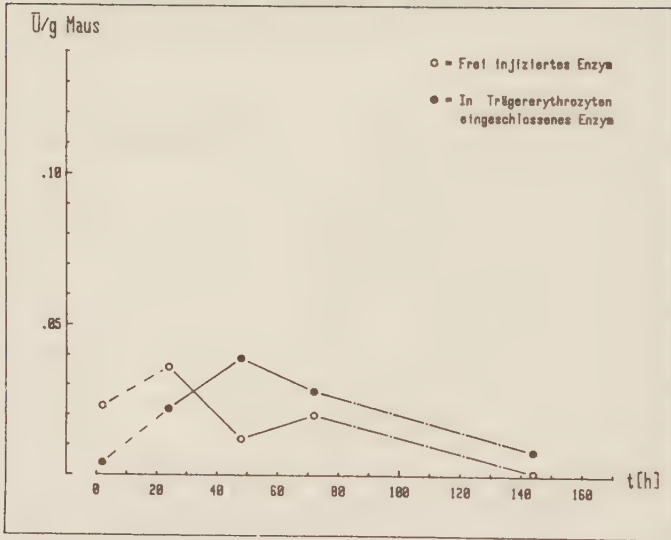


Diagramm 11

#### 4. Diskussion der Ergebnisse

##### 4.1. Enzym - Transportkinetik der Trägererythrozyten

Trägererythrozyten werden als in vivo "carriers" für die Therapie angeborener metabolischer Krankheiten vorgeschlagen (46,47,94). Die Vorgehensweise ist dabei im Wesentlichen folgende: Nach zweimaligem Waschen der Erythrozyten in einer isotonischen, d. h. dem physiologischen osmotischen Druck des Blutserums entsprechenden Lösung erfolgt nach Zugabe von Enzym eine hypoosmotische Dialyse. Durch die Störung des osmotischen Gleichgewichts zwischen Erythrozyt und Außenmedium kommt es zu einem in das Zellinnere gerichteten Wasserfluß. Die Zelle nimmt an Volumen zu und zerreißt bei Erreichen eines kritischen Volumens. Die entstandenen Löcher sind von molekularer Dimension (94, 95) und ermöglichen einen Austausch von Hämoglobin und intrazellulären Proteinen (76, 77, 78, 79, 80, 94, 95) gegen  $\alpha$ -Glucosidase, die nach Barmann (2) ein Molekulargewicht von über 68500 hat.

Die Dauer dieser Diffusionsvorgänge hängt stark von der Temperatur ab, bei der die hypoosmotische Dialyse durchgeführt wird. So kann mit einer Durchlässigkeit der Zellmembran für einen Zeitraum von Minuten bis Stunden gerechnet werden, sofern die Temperaturen 40°C nicht überschreiten.

Der entgeltliche Verschluß der Erythrozyten erfolgt durch Zugabe von isoosmotischem Puffer bei einer Temperatur von 37°C über enzymatisch ablaufende Prozesse in der Zellmembran. Ihre ursprünglichen Eigenschaften können so wieder hergestellt werden (94, 95).

Mit dieser Methode präparierte Trägererythrozyten enthalten noch 70% ihres ursprünglichen ATP, Hämoglobin und Glucose-6-Phosphat Dehydrogenasegehalts und einer unbekannten Menge der  $\alpha$ -Glucosidase, die dann im Erfolgsorgan Leber im Vergleich zu direkt substituiertem Enzym gemessen wurde. Der transmembranöse Ausgleich von Glucose und NaCl wird durch diese Maß-

nahmen nicht beeinflußt. Das mittlere korpuskuläre Volumen der Trägererythrozyten ist kleiner als das der unbehandelten Erythrozyten (76, 78, 80).

Bei angeborenen lysosomalen Stoffwechselkrankheiten, wie zum Beispiel der Morbus Pompe, ist bei dem Gebrauch von Trägererythrozyten von Interesse, daß in der Leber sowohl Kupffersche Sternzellen wie auch Hepatozyten in den Aufnahmevorgang des injizierten Enzyms eingeschlossen sind (19). Das eingeschlossene Material wird durch Endozytose mit verspäteter Freisetzung nach Abbau des Transportvehikels durch lysosomale Phosphorlipasen eliminiert (19). Ein weiterer Vorteil bei dem Einschluß des zu substituierenden Enzyms in patienteneigene Erythrozyten ist die Ausschaltung immunologischer Reaktionen oder allgemeine Unverträglichkeiten, sofern hoch gereinigtes, nicht immunologisches, steriles, möglichst aus menschlichen Quellen gewonnenes Enzym verwendet wird.

In dieser Arbeit wurden bei keinem der Versuchstiere immunologische Reaktionen festgestellt, da nur mäuseeigene Erythrozyten mit hochgereinigter  $\alpha$ -Glucosidase beladen wurden.

#### 4.2. Ergebnisse der Hauptversuche

Wie schon unter Punkt 1.2.3. erläutert, ist das Ziel der Versuche, die Brauchbarkeit eines Transportvehikels zu testen. Aus diesem Grund finden sich in allen Diagrammen neben den Meßwerten für frei injiziertes Enzym auch diejenigen Ergebnisse des in Trägererythrozyten eingeschlossenen Enzyms.

Im Vordergrund der Diskussion stehen die Aktivitätsverläufe bei den unterschiedlichen Applikationsarten, da die Absolutbeträge innerhalb eines Versuchs nur bedingt vergleichbar sind. Dies liegt daran, daß die frei injizierte Enzymmenge genau bekannt ist, während die in Trägererythrozyten eingeschlossene Enzymmenge von der unter 3.1.3. beschriebenen Dialysetechnik abhängt.

Eine generelle Tendenz läßt bei grober Durchsicht der Ergebnisse einen deutlichen Unterschied in der Halbwertszeit erkennen. Während das freie Enzym seine höchsten Werte unmittelbar nach der Injektion in der Leber erreicht und anschließend kontinuierlich abfällt, ist bei dem in Trägererythrozyten eingeschlossenen Enzym ein deutlicher Verzögerungseffekt zu erkennen. Dieser läßt sich damit erklären, daß das Enzym, eingeschlossen in ein biologisch abbaubares, nicht toxisches, nicht immunologisches Trägersystem, nicht sofort verstoffwechselt werden kann.

In den drei Hauptversuchen kamen die beiden Enzyme Amyloglucosidase und  $\alpha$ -Glucosidase zum Einsatz, deren pH-Optima bereits in den Vorversuchen (3.2.3.) bestimmt wurden. Wie an pH-Messungen von unbehandeltem Leberhomogenat gezeigt werden konnte (3.2.3.), liegt das Umsatzmaximum der lebereigenen Enzyme bei einem pH-Wert von etwa 6. Dieser pH-Wert stellt für die  $\alpha$ -Glucosidase ideale Voraussetzungen dar, weshalb dieses Enzym in den Hauptversuchen 2 und 3 in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurde. Die Amyloglucosidase wurde im ersten Hauptversuch eingesetzt, wobei der

Testansatz ebenfalls in die Nähe des ermittelten pH-Optimums gepuffert wurde.

Die Ergebnisse der Enzymaktivität der Amyloglucosidase im Hauptversuch 1 sind in den Diagrammen 6 und 7 dargestellt. Man erkennt bei dem 2-Stundenwert in Abbildung 6, daß das frei injizierte Enzym bezogen auf das Lebergewicht eine um etwa 12% höhere Aktivität aufweist als das eingeschlossene Enzym. Letzteres zeigt jedoch einen Aktivitätsanstieg mit einer Zunahme um 27% gegenüber dem 2-Stundenwert mit einem Maximum nach etwa 24 Stunden, während die Aktivität des frei injizierten Enzyms zu diesem Zeitpunkt bereits um etwa den gleichen prozentualen Anteil gefallen ist. Bei dem zeitlichen Verlauf der Aktivitätswerte ist zu beachten, daß bei nur 4 Beobachtungsintervallen nach Enzymverabreichung die absoluten Extremwerte unter Umständen nicht zur Darstellung kommen, da das Kurvenmaximum zwischen zwei Meßpunkten liegen kann. Setzt man einen stetigen Kurvenverlauf voraus, so ist unter Einbeziehung der Anfangsbedingung (zum Zeitpunkt  $t=0$  liegt aufgrund der Leerwertsubtraktion keine Aktivität in der Leber vor) ein Aktivitätsmaximum zwischen den ersten beiden Messungen zu erwarten. Die dargestellten Linien zwischen dem ersten und zweiten Meßpunkt sind deshalb gestrichelt, da sie nicht den Verlauf der Enzymaktivität angeben. Das Aktivitätsmaximum des eingeschlossenen Enzyms liegt demnach früher und höher als in den Diagrammen dargestellt, und kann nach etwa 15 Stunden in der Größenordnung von 1 U/g Leber erwartet werden. Unter der gleichen Voraussetzung liegt das Aktivitätsmaximum des frei injizierten Enzyms später als in Diagramm dargestellt etwa bei 10 Stunden nach Substitution. Diese Interpretation der Enzymkonzentration in der Anfangsphase ist aufgrund fehlender engmaschiger Messungen nur spekulativ möglich und müßte durch zusätzliche Messungen ergänzt werden. Der weitere Verlauf der Aktivitäten wird durch den in dieser Arbeit mehr interessierenden kontinuierlichen Abbau der Enzymkonzentrationen bestimmt. Hier zeigt sich zwischen den beiden letzten Messungen ein etwa gleicher Gradient unabhängig von der Applikationsart mit einem anfänglichen steilen Bereich und zunehmender Abflachung. Die absolute Enzymkonzentration bleibt somit aufgrund

des späteren und vermutlich auch höheren Maximums im Falle des in Trägererythrozyten eingeschlossenen Enzyms deutlich oberhalb der gemessenen Aktivität des frei injizierten Enzyms. Nach 6 Tagen ist die Konzentration noch doppelt so hoch und liegt bei etwa 25% des Maximalwertes, während die Konzentration des frei injizierten Enzyms auf etwa 15% abgefallen ist.

Bei Substitution von  $\alpha$ -Glucosidase im zweiten Hauptversuch bleiben die Tendenzen ähnlich wie im ersten Hauptversuch. Die Diagramme zeigen, daß die Freisetzung aus den Trägererythrozyten langsamer erfolgt, sodaß ein Maximum nicht vor 48 Stunden nach Injektion zu erwarten ist. Zu diesem Zeitpunkt ist die frei injizierte Enzymmenge bereits auf über 50% ihres Maximalwertes abgefallen und liegt auch im weiteren Verlauf deutlich unter den Werten für eingeschlossen substituiertes Enzym. Eine weitere Besonderheit liegt in dem erneuten Anstieg der Enzymkonzentration zwischen dem 48-Stunden- und dem 168-Stundenwert. Eine mögliche Erklärung wäre die überschießende Rückkopplungsreaktion des Mäuseorganismus auf das plötzliche Überfluten mit substituiertem Enzym. Demnach wäre der Beginn der Abbauphase eine Überlagerung der kurzzeitig reaktiv verminderten Enzymsynthese und des Enzymabbaus. Nach 7-Tagen haben sich wieder normale Enzymsyntheseraten eingestellt und ergeben in der Summenmessung einen insgesamt etwas höheren Wert. Aufgrund der langsameren Freisetzung des substituierten Enzyms aus den Trägererythrozyten wird diese Reaktion nicht beobachtet.

Im dritten Hauptversuch wurde ebenfalls  $\alpha$ -Glucosidase injiziert. Gegenüber dem zweiten Hauptversuch wurde jedoch die Menge verdoppelt, und auch mehr Versuchstiere pro Gruppe eingesetzt. Der Verlauf der Enzymkonzentration in den Diagrammen 10 und 11 gibt vorallem über die Anfangsphase Aufschluß. Man erkennt deutlich das wesentlich spätere Auftreten der maximalen Aktivität des eingeschlossenen Enzyms. Dieser Verzögerungseffekt erklärt sich damit, daß das Enzym, eingeschlossen in ein biologisch abbaubares, nicht toxisches, nicht immunologisches Trägersystem, nicht sofort verstoffwechselt werden kann. Während des zweiten Tages nach der Injektion wird

eine deutlichere Aktivitätszunahme registriert als während der ersten 24 Stunden, was auch im zweiten Hauptversuch schon angedeutet erkennbar ist. Der anfänglich kleinere Gradient deutet auf eine verzögerte initiale Enzymfreisetzung hin, was bei Kenntnis der genaueren Kinetik einer weiteren Abklärung bedarf. Das frei injizierte Enzym zeigt einen kontinuierlichen Abfall, wobei auch der flache Gradient zwischen dem 2-Stunden- und dem 24-Stundenwert nicht als beginnende Abbauphase zu deuten ist, sondern wie schon beschrieben das Maximum in nicht näher abgeklärter Form verschleiert. Der folgende starke Abfall führt zu den wesentlich niedrigeren Aktivitätswerten nach dem zweiten Tag, die im folgenden wieder, wie schon im ersten Hauptversuch beobachtet, fast parallel zu den Werten des eingeschlossenen Enzyms verlaufen. Nach 7 Tagen betragen sie noch ein Drittel der Aktivitätswerte des in Trägererythrozyten eingeschlossenen Enzyms.

Die Absolutbeträge der Enzymaktivität zwischen den einzelnen Hauptversuchen sind untereinander nicht vergleichbar, da die Versuchstiere unterschiedlicher Herkunft waren, und die äußeren Bedingungen (siehe 4.2.) sich nicht genügend standardisieren ließen. So zeigten z.B. die Versuchstiere des zweiten Hauptversuches extrem aggressives Verhalten und waren sichtlich durch den erst kürzlich erfolgten Transport beeinflusst, was sich auch in den Abweichungen der Absolutbeträge der Enzymaktivität von den vorangegangenen Messungen widerspiegelt.

Die Diagramme 7, 9 und 11 enthalten die Darstellung der Meßergebnisse bezogen auf das Körpergewicht der Versuchstiere. Die Aktivitätsverläufe sind ähnlich den zuvor beschriebenen, obwohl nur eine geringe Korrelation zwischen dem Leber- und dem Körpergewicht (Diagramm 5) nachgewiesen wurde. Bei fast identischen Aktivitätsdifferenzen zwischen beiden Applikationsarten nach etwa zwei Tagen finden sich aber bei allen Hauptversuchen geringere Differenzen nach Abschluß der Messungen am 6. bzw. 7. Tag. Dies deutet auf eine langfristig geringere Wirksamkeit der Enzymsubstitution mittels eines Trägersystems bei erhöhtem Körpergewicht hin. Eine genauere Untersuchung und Diskussion

der Enzymkinetik unter Einbeziehung der körperrgewichtabhängigen Stoffwechselvorgänge wäre bei Bestätigung dieses ersten Hinweises in weiteren Versuchen notwendig.

#### 4.3. Einfluß von Umweltfaktoren

##### 4.3.1. Auswahl der Versuchstiere

Die in den Hauptversuchen 1 und 2 verwendeten Versuchstiere kamen aus der Süddeutschen Versuchstierfarm GmbH und Co KG Tuttlingen, und aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover (dritter Hauptversuch).

Alle Versuche wurden mit 8 bis 12 Wochen alten, männlichen Mäusen des gleichen Stammes (NMRI) durchgeführt, die zum jeweiligen Versuchstermin das gleiche Alter hatten, sich aber in Gewicht und Aufzuchtbedingungen unterschieden.

##### 4.3.2. Tagesrhythmik der $\alpha$ - Glucosidase

Zahlreiche Funktionen bei Mensch und Tier sind zyklischen Schwankungen unterworfen. Einflüsse dieser Art wurden durch folgende Maßnahmen berücksichtigt:

1. Die gewonnenen Meßwerte stellen Differenzwerte dar. Parallel zu der mit freiem oder mit in Trägererythrozyten eingeschlossenen Enzym behandelten Versuchstiergruppe und Messung deren Enzymaktivität wurde unter gleichen Bedingungen eine unbehandelte Kontrollgruppe mitgeführt, deren Enzymaktivität subtrahiert wurde.
2. Der zirkadianen Rhythmik wurde durch Beibehaltung der jeweils gleichen Tageszeit für die Versuchsdurchführung Rechnung getragen.

#### 4.3.3. Klimatische Einflüsse

Einflüsse von klimatischen Reizen auf den Enzymgehalt der Leber und die Transportvorgänge im Blut für die hier untersuchten Substanzen sind nicht bekannt. Da der Stoffwechsel jedoch solchen Einflüssen unterliegt, sollte anhand einer Gegenüberstellung von Mess- und Klimawerten eine mögliche Korrelation überprüft werden.

Zu diesem Zweck wurden für die Versuchstage des Hauptversuchs 1 und 2 beim Deutschen Wetterdienst die Werte für

- Lufttemperatur
- relative Luftfeuchtigkeit
- Barometerdruck

abgefragt und in den Diagrammen 12 bis 14 dargestellt. Weitere Hinweise, sowie die einzelnen Tageswerte sind Tabelle 13 zu entnehmen.

- Lufttemperatur: Die maximale Tagestemperatur schwankte an den Versuchstagen zwischen 18°C und 22°C. Eine leichte Tendenz zu höheren Enzymkonzentrationen bei niedrigeren Temperaturen läßt sich in Diagramm 12 erkennen. Um eine Korrelation sicher zu belegen, reichen die wenigen Daten und der errechnete Korrelationskoeffizient von 0.6 jedoch nicht aus.
- Relative Feuchtigkeit: Diagramm 13 zeigt ebenfalls nur eine geringe Korrelation (0.56), wobei hier die Tendenz zu höheren Enzymkonzentrationen bei Zunahme der relativen Feuchtigkeit geht.
- Barometerdruck: Erwartungsgemäß zeigt sich hier, wie aus Diagramm 14 ersichtlich, keine Abhängigkeit bei Luftdruckschwankungen zwischen 953 mbar und 962 mbar und den gemessenen Enzymwerten.

Zusammenfassend lassen sich keine eindeutigen Aussagen über

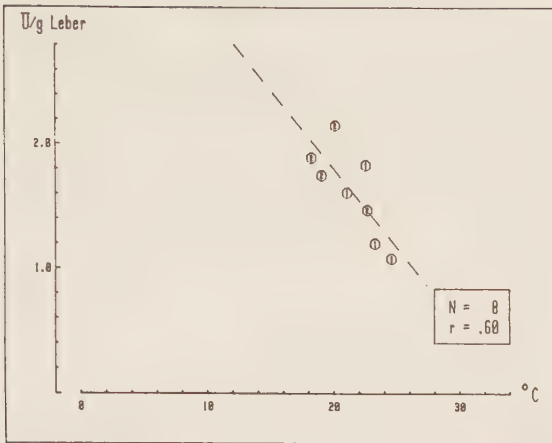


Diagramm 12

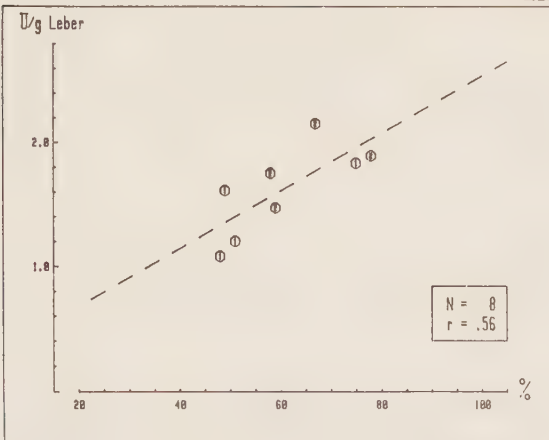


Diagramm 13

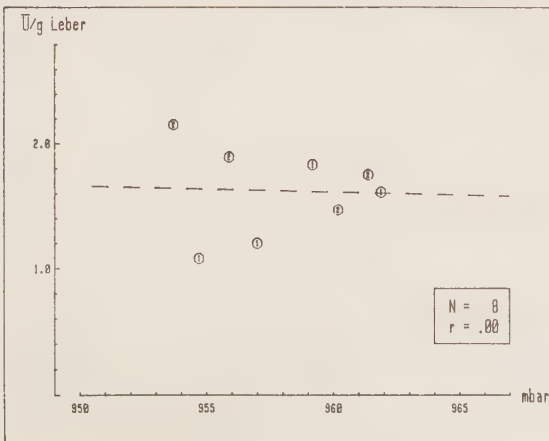


Diagramm 14

eventuelle klimatische "Stressfaktoren" treffen. Die Schwankungsbreite der Enzymwerte zeigt jedoch die Notwendigkeit, Kontrollgruppen wie unter Punkt 4.2. beschrieben, mitzuführen, die den gleichen klimatischen Einflüssen wie die Kontrollmäuse unterliegen. Für genauere Messungen der Enzymkinetik wären noch weitergehend standardisierte Versuchsbedingungen, sowie klimatisierte Tierhaltung und Laboratorien unbedingt erforderlich.

#### 4.4. Betrachtung der Fehlermöglichkeiten

Durch Verwendung von käuflichen Testansätzen zur Enzymbestimmung und äußerste Sorgfalt bei der Herstellung der verwendeten Puffer konnten systematische Fehler weitgehend vermieden werden. Gleiches galt für die Verarbeitung der Proben. Es wurden Eppendorf-Pipetten mit einer maximalen Abweichung von 1% verwendet und bei der Handhabung die Herstellervorschriften beachtet.

Die Inkubationstemperaturen wurden thermostatisch überwacht und mit einem Thermometer kontrolliert. Die Kontrolle des pH-Wertes erfolgte mittels eines vor dem Versuch kalibrierten pH-Meters mit digitaler Anzeige.

Die photometrischen Messungen wurden an dem UV/Visspectrometer 550 S der Firma Perkin/Elmer durchgeführt. Nach Kontrolle der vorgeschriebenen Wellenlänge (365nm) bzw. des Filters, sowie der Spaltblende wurde vor jeder Messung ein exakter Nullpunktabgleich vorgenommen.

Die Proben wurden in Einmalküvetten nach sorgfältiger Beschriftung zum Schutz gegen Vertauschen in das Gerät eingesetzt, und die Extinktion mit einer Genauigkeit von drei Stellen hinter dem Komma abgelesen.

Der zufällige Fehler wurde durch Bildung von Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen jedes Testansatzes und durch den Einsatz von bis zu 6 Versuchstieren in der gleichen Versuchsreihe

verringert.

Im Übrigen wurden alle Richtlinien für die Messung von Enzymaktivitäten (5) beachtet.

#### 4.5. Zusammenfassung

Bei der vorliegenden Arbeit wurde der 1-4  $\alpha$ - Glucosidasemangel (Morbus Pompe) als der Prototyp einer lysosomalen Speicherkrankheit betrachtet, bei der der Enzymtherapie hauptsächlich aufgrund immunologischer Probleme und initial überhöhter Konzentrationen an Wirksamkeit und Dauerhaftigkeit Grenzen gesetzt sind. Der Vorteil beim Gebrauch von Enzymen im Gegensatz zu zytotoxischen Mitteln ist das Ausbleiben nachteiliger Wirkungen auf normales Gewebe, und die Konzentration der therapeutischen Bemühungen auf den Wirkort. Wird ein Transportvehikel für das Enzym gewählt, so bieten sich folgende Vorteile an:

- Immunologische Reaktionen von seiten des Enzyms können vermieden werden, da das Enzym durch den Träger "gerichtet" an den Wirkort gelangt.
- Die Verstoffwechselung findet nicht sofort nach der Injektion statt.

Als Transportmittel wurden hier versuchstiereigene Erythrozyten für das zu substituierende Enzym gewählt. Versuchstiere waren gesunde Mäuse, denen einerseits mit 1-4  $\alpha$ - Glucosidase beladene Erythrozyten und freies Enzym gespritzt wurde. Die Präparation der Erythrozyten folgte dem Prinzip der hypoosmolaren Dialyse. Nach der Injektion wurde den Mäusen in bestimmten Zeitabständen die Leber entnommen, und die Aktivität des dort angereicherten Enzyms gemessen. In Vorversuchen wurden die Michaeliskonstante, die pH-Optimumkurven der eingesetzten Enzyme, die Eigenaktivität des Lebergewebes und physikalische Einflüsse auf das Lebergewebe untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß das frei injizierte Enzym kurzfristig starke Aktivität gegenüber dem Substrat besitzt, was auch mit den initial erhöhten Enzymwerten in der Leber korreliert, aber in der Wirkdauer gegenüber dem in Trägererythrozyten eingeschlossenen Enzym erheblich herabgesetzt ist, vorallem in der initialen Abbauphase nach etwa 24 Stunden ist ein wesentlich stärkerer

Aktivitätsverlust zu beobachten.

Nach verzögerter Aufnahme in der Leber wird das in Trägererythrozyten eingeschlossene Enzym nur langsam aus dem "carrier" freigesetzt und demzufolge auch verzögert in der Leber abgebaut. Es konnte demnach in dieser Arbeit gezeigt werden, daß prinzipiell diese Art der Enzymsubstitution Vorteile gegenüber der freien Injektion bringt. In Ergänzung zu den hier vorliegenden Ergebnissen wären weiterhin engmaschige Messungen während der ersten 48 Stunden sinnvoll, um die Aufnahme- und Abbaukinetik genauer zu erforschen.

5. Tabellen

Tabelle 1

| Maltosekonzentration<br>im Testansatz:<br>(mg Maltose/ ml Testansatz) | Enzymaktivität ( $\alpha$ - Glucosidase)<br>( $\bar{U}$ / ml Probe) |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 12.5                                                                  | 33.06                                                               |
| 25                                                                    | 48.18                                                               |
| 50                                                                    | 86.91                                                               |
| 75                                                                    | 98.25                                                               |
| 100                                                                   | 115.25                                                              |

Die Werte wurden aus Dreifachbestimmungen gemittelt.

Versuchsbedingungen:

Testansatz: 0.01 ml Probe ( 0.005 ml  $\alpha$ -Glucosidase + 0.005 ml  
NaCl )

0.5 ml Maltoselösung

1.49 ml Puffer

pH =6; Temperatur 25°C; 5 min inkubiert, 3 min hitzedenaturiert.

Tabelle 2

| $\alpha$ - Glucosidase<br>(ml Enzym/ ml Probe) | $\bar{U}$ /ml Probe |
|------------------------------------------------|---------------------|
| 0.01                                           | 152.09              |
| 0.0067                                         | 103.86              |
| 0.005                                          | 86.91               |
| 0.0025                                         | 44.40               |
| 0.00125                                        | 22.67               |

Die Werte wurden aus Dreifachbestimmungen gemittelt.

Versuchsbedingungen:

Testansatz: 0.01 ml Probe ( $\alpha$ -Glucosidase + NaCl, wie oben  
angegeben verdünnt)

0.5 ml Maltose (200 mg Maltose/ml Maltoselösung)

1.49 ml Puffer

pH =6; Temperatur 25°C; 5 min inkubiert, 3 min hitzedenaturiert.

Tabelle 3

pH-Optimum der  $\alpha$ - Glucosidase (Sigma G 7256)

| pH  | $\bar{U}/\text{ml}$ Probe |
|-----|---------------------------|
| 4   | 21.10                     |
| 4.5 | 33.03                     |
| 5   | 69.74                     |
| 5.5 | 90.85                     |
| 6   | 84.43                     |
| 6.5 | 62.40                     |
| 7   | 33.95                     |
| 7.5 | 26.61                     |
| 8   | 12.8                      |

Die Werte wurden aus Dreifachbestimmungen gemittelt.

Versuchsbedingungen:

Testansatz: 0.01 ml Probe ( 0.005 ml  $\alpha$ -Glucosidase + 0.005 ml  
NaCl )  
0.5 ml Maltose (200 mg/ml)  
1.49 ml Puffer

pH =6; Temperatur 25°C; 5 min inkubiert, 3 min hitzedenaturiert.

Tabelle 4

pH-Optimum der Amyloglucosidase (Boehringer Nr. 102857)

| pH  | $\bar{U}/\text{ml}$ Probe |
|-----|---------------------------|
| 3   | 2.69                      |
| 3.3 | 2.83                      |
| 4   | 2.72                      |
| 4.5 | 2.56                      |
| 5   | 2.62                      |
| 5.5 | 2.05                      |
| 6   | 1.27                      |
| 6.5 | 0.94                      |

Die Werte wurden aus Doppelbestimmungen ermittelt.

Versuchsbedingungen:

Testansatz: 0.02 ml Probe (Amyloglucosidase 1:10 mit NaCl  
verdünnt)

0.2 ml Maltose (200 mg/ml)

0.7 ml Puffer

pH =6; Temperatur 25°C; 18 min inkubiert, 3 min hitzedenaturiert.

Tabelle 5

| Meßreihe | Leber (g) | U/g Leber | $\bar{U}$ /g Leber |
|----------|-----------|-----------|--------------------|
| M I      | 0.112     | 3.03      | 2.80               |
|          | 0.125     | 2.63      |                    |
|          | 0.114     | 2.76      |                    |
| M II     | 0.133     | 3.19      | 3.26               |
|          | 0.120     | 3.33      |                    |
| M III    | 0.150     | 3.08      | 3.38               |
|          | 0.138     | 3.48      |                    |
|          | 0.093     | 3.60      |                    |
| M IV     | 0.150     | 3.56      | 3.48               |
|          | 0.138     | 3.11      |                    |
|          | 0.093     | 3.77      |                    |

Die Werte wurden in Doppelbestimmungen ermittelt.

Gewicht : Maus: 30.65 g  
Leber: 1.312 g

Versuchsbedingungen:

Homogenisierung jedes Leberanteils mit 0.05 ml (M I, M II) oder  
mit 1 ml (M III, M IV) Puffer.

Testansatz: 0.1 ml Probe  
1.4 ml Puffer  
0.25 ml Maltose (300 mg/ml)

Inkubationszeit: 60 min, Denaturierung durch Hitze: 5 min,  
Temperatur: 37°C

Puffer: 0.25M Mannit/ 3mmol Imidazol HCl Puffer, pH 7.2

Tabelle 6

| Maus | pH  | U/g Leber | $\bar{U}$ /g Leber |
|------|-----|-----------|--------------------|
| A    | 3.3 | 2.56      | 1.97               |
| B    | 3.3 | 2.83      |                    |
| C    | 3.3 | 2.0       |                    |
| D    | 3.3 | 1.21      |                    |
| E    | 3.3 | 1.23      |                    |
| A    | 5   | 4.93      | 3.90               |
| B    | 5   | 4.82      |                    |
| C    | 5   | 3.61      |                    |
| D    | 5   | 2.34      |                    |
| E    | 5   | 3.82      |                    |
| A    | 6   | 3.95      | 4.01               |
| B    | 6   | 4.47      |                    |
| C    | 6   | 4.10      |                    |
| D    | 6   | 2.67      |                    |
| E    | 6   | 4.88      |                    |

Für jeden Wert wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

|   | Maus (g) | Leber (g) |
|---|----------|-----------|
| A | 32.74    | 1.589     |
| B | 32.28    | 1.373     |
| C | 32.24    | 1.472     |
| D | 38.54    | 2.073     |
| E | 35.05    | 1.615     |

Versuchsbedingungen:

Testansatz:    1.4 ml Puffer  
                  0.1 ml Probe (Leberhomogenat)  
                  0.5 ml Maltose (200 mg/ml)

Temperatur: 37°C, 60 min Inkubation, 5 min Hitzedenaturierung.

Tabelle 7

Hauptversuch 1

|    | Maus (g) | Leber (g) | Zeitpunkt (h) | Enzym E<br>Ghost G<br>NaCl N | U/g Leber |
|----|----------|-----------|---------------|------------------------------|-----------|
| 37 | 34.61    | 2.04      | 1             | E                            | 2.10      |
| 38 | 35.87    | 1.791     | 1             | E                            | 1.87      |
| 39 | 32.80    | 1.792     | 1             | E                            | 2.8       |
| 40 | 29.18    | 1.485     | 1             | G                            | 2.39      |
| 41 | 34.37    | 1.642     | 1             | G                            | 3.19      |
| 42 | 35.38    | 1.803     | 1             | G                            | 2.14      |
| 43 | 35.75    | 1.628     | 1             | N                            | 1.68      |
| 44 | 25.47    | 1.122     | 1             | N                            | 1.93      |
| 45 | 34.91    | 1.948     | 3             | E                            | 2.30      |
| 46 | 33.62    | 1.925     | 3             | E                            | 2.82      |
| 47 | 32.28    | 1.602     | 3             | E                            | 2.81      |
| 48 | 34.84    | 1.856     | 3             | G                            | 2.20      |
| 49 | 33.96    | 1.323     | 3             | G                            | 2.30      |
| 50 | 32.5     | 1.539     | 3             | G                            | 1.84      |
| 51 | 34.38    | 1.868     | 3             | N                            | 1.31      |
| 52 | 32.48    | 1.542     | 3             | N                            | 1.54      |
| 53 | 32.12    | 1.666     | 24            | E                            | 1.52      |
| 54 | 36.24    | 2.222     | 24            | E                            | 2.51      |
| 55 | 36.54    | 2.008     | 24            | E                            | 1.81      |
| 56 | 36.49    | 1.897     | 24            | G                            | 1.02      |
| 57 | 33.54    | 1.820     | 24            | G                            | 3.44      |
| 58 | 32.91    | 1.766     | 24            | G                            | 1.90      |

| $\bar{U}/g$ Leber | U/Leber | $\bar{U}/Leber$ | U/g Maus | $\bar{U}/g$ Maus |
|-------------------|---------|-----------------|----------|------------------|
| 2.25              | 4.28    | 4.21            | 0.123    | 0.114            |
|                   | 3.35    |                 | 0.093    |                  |
|                   | 5.01    |                 | 0.128    |                  |
| 2.57              | 3.55    | 4.21            | 0.121    | 0.125            |
|                   | 5.23    |                 | 0.152    |                  |
|                   | 3.85    |                 | 0.108    |                  |
| 1.80              | 2.74    | 2.45            | 0.076    | 0.086            |
|                   | 2.16    |                 | 0.096    |                  |
| 2.64              | 4.48    | 4.87            | 0.128    | 0.144            |
|                   | 5.61    |                 | 0.166    |                  |
|                   | 4.52    |                 | 0.140    |                  |
| 2.11              | 5.22    | 3.69            | 0.149    | 0.108            |
|                   | 3.04    |                 | 0.089    |                  |
|                   | 2.83    |                 | 0.087    |                  |
| 1.42              | 2.45    | 2.41            | 0.071    | 0.071            |
|                   | 2.37    |                 | 0.072    |                  |
| 1.85              | 2.53    | 3.91            | 0.078    | 0.110            |
|                   | 5.57    |                 | 0.153    |                  |
|                   | 3.63    |                 | 0.099    |                  |
| 2.12              | 1.93    | 3.84            | 0.052    | 0.113            |
|                   | 6.26    |                 | 0.186    |                  |
|                   | 3.35    |                 | 0.101    |                  |

|    |       |       |     |   |       |
|----|-------|-------|-----|---|-------|
| 59 | 33.13 | 1.692 | 24  | N | 0.97  |
| 60 | 30.19 | 1.592 | 24  | N | 1.44  |
| 61 | 36.32 | 1.802 | 48  | E | 1.39  |
| 62 | 37.58 | 2.026 | 48  | E | 1.13  |
| 63 | 35.41 | 1.618 | 48  | E | 1.45  |
| 64 | 31.83 | 1.704 | 48  | G | 2.38  |
| 65 | 36.48 | 2.097 | 48  | G | 1.14  |
| 66 | 36.90 | 2.146 | 48  | G | 1.21  |
| 67 | 29.92 | 1.588 | 48  | N | 1.106 |
| 68 | 30.62 | 1.663 | 48  | N | 1.0   |
| 69 | 32.56 | 1.4   | 144 | E | 2.45  |
| 70 | 36.23 | 1.515 | 144 | E | 1.67  |
| 71 | 42.18 | 1.752 | 144 | E | 1.77  |
| 72 | 33.78 | 1.667 | 144 | G | 2.15  |
| 73 | 34.12 | 1.327 | 144 | G | 2.26  |
| 74 | 35.0  | 1.591 | 144 | G | 1.84  |
| 75 | 29.27 | 1.407 | 144 | N | 1.83  |

Jeder Wert wurde in Doppelbestimmungen ermittelt.

Versuchsbedingungen:

Testansatz: 1.4 ml Puffer (pH 3.3)  
0.1 ml Probe  
0.5 ml Maltose (300 mg/ml)

Temperatur 37°C, Inkubationszeit 60 min, Hitzedenaturierung 5 min.

|      |      |      |       |       |
|------|------|------|-------|-------|
| 1.20 | 1.64 |      | 0.049 |       |
|      | 2.29 | 1.96 | 0.064 | 0.056 |
| 1.32 | 2.50 |      | 0.068 |       |
|      | 2.29 | 2.38 | 0.060 | 0.065 |
|      | 2.39 |      | 0.067 |       |
| 1.57 | 4.05 |      | 0.127 |       |
|      | 2.4  | 3.01 | 0.066 | 0.087 |
|      | 2.59 |      | 0.070 |       |
| 1.08 | 1.75 |      | 0.058 |       |
|      | 1.66 | 1.70 | 0.054 | 0.056 |
| 1.96 | 4.07 |      | 0.125 |       |
|      | 2.53 | 3.23 | 0.070 | 0.090 |
|      | 3.10 |      | 0.073 |       |
| 2.08 | 3.58 |      | 0.106 |       |
|      | 2.99 | 3.16 | 0.087 | 0.092 |
|      | 2.93 |      | 0.083 |       |
| 1.83 | 2.57 | 2.57 | 0.087 | 0.087 |

Tabelle 8

Hauptversuch 2

|    | Maus (g) | Leber (g) | Zeitpunkt (h) | Enzym E<br>Ghost G<br>NaCl N | U/g Leber |
|----|----------|-----------|---------------|------------------------------|-----------|
| 76 | 35.02    | 1.729     | 1             | E                            | 3.25      |
| 77 | 37.30    | 1.738     | 1             | E                            | 3.60      |
| 78 | 38.45    | 1.798     | 1             | E                            | 3.23      |
| 79 | 40.74    | 2.317     | 1             | G                            | 2.78      |
| 80 | 37.59    | 1.917     | 1             | G                            | 2.75      |
| 81 | 37.65    | 1.697     | 1             | G                            | 3.20      |
| 82 | 44.05    | 1.775     | 1             | N                            | 2.78      |
| 83 | 39.49    | 1.811     | 1             | N                            | 2.58      |
| 84 | 38.43    | 1.535     | 1             | N                            | 2.13      |
| 85 | 38.37    | 1.737     | 3             | E                            | 2.97      |
| 86 | 39.00    | 1.847     | 3             | E                            | 2.89      |
| 88 | 41.52    | 2.010     | 3             | G                            | 2.79      |
| 89 | 41.08    | 1.755     | 3             | G                            | 2.61      |
| 90 | 37.76    | 1.596     | 3             | G                            | 3.19      |
| 92 | 36.18    | 1.582     | 3             | N                            | 1.51      |
| 93 | 40.57    | 1.990     | 3             | N                            | 2.11      |
| 94 | 42.07    | 2.106     | 24            | E                            | 2.57      |
| 95 | 44.51    | 2.247     | 24            | E                            | 2.56      |
| 97 | 40.82    | 1.705     | 24            | G                            | 2.48      |
| 98 | 36.86    | 1.774     | 24            | G                            | 2.35      |
| 99 | 41.69    | 1.759     | 24            | G                            | 3.01      |

| $\bar{U}/g$ Leber | U/Leber | $\bar{U}/Leber$ | U/g Maus | $\bar{U}/g$ Maus |
|-------------------|---------|-----------------|----------|------------------|
| 3.36              | 5.62    | 5.89            | 0.160    | 0.159            |
|                   | 6.25    |                 | 0.167    |                  |
|                   | 5.80    |                 | 0.151    |                  |
| 2.91              | 6.44    | 5.71            | 0.158    | 0.147            |
|                   | 5.27    |                 | 0.140    |                  |
|                   | 5.43    |                 | 0.144    |                  |
| 2.49              | 4.93    | 4.28            | 0.112    | 0.105            |
|                   | 4.67    |                 | 0.118    |                  |
|                   | 3.26    |                 | 0.085    |                  |
| 2.93              | 5.15    | 5.24            | 0.134    | 0.135            |
|                   | 5.33    |                 | 0.136    |                  |
| 2.67              | 5.60    | 4.81            | 0.135    | 0.119            |
|                   | 4.58    |                 | 0.111    |                  |
|                   | 4.26    |                 | 0.112    |                  |
| 1.81              | 2.38    | 3.28            | 0.066    | 0.084            |
|                   | 4.19    |                 | 0.103    |                  |
| 2.56              | 5.41    | 5.58            | 0.128    | 0.128            |
|                   | 5.75    |                 | 0.129    |                  |
| 2.61              | 4.22    | 4.55            | 0.103    | 0.114            |
|                   | 4.16    |                 | 0.113    |                  |
|                   | 5.29    |                 | 0.126    |                  |

|     |       |       |     |   |      |
|-----|-------|-------|-----|---|------|
| 100 | 35.49 | 1.418 | 24  | N | 1.99 |
| 101 | 36.13 | 1.743 | 24  | N | 1.51 |
| 102 | 39.50 | 1.770 | 24  | N | 2.17 |
| 103 | 39.88 | 1.718 | 48  | E | 2.11 |
| 104 | 43.20 | 2.226 | 48  | E | 2.44 |
| 106 | 35.82 | 2.026 | 48  | G | 2.57 |
| 107 | 46.31 | 2.185 | 48  | G | 2.60 |
| 109 | 42.88 | 1.834 | 48  | N | 1.67 |
| 110 | 39.15 | 1.987 | 48  | N | 2.48 |
| 111 | 37.76 | 2.310 | 48  | N | 1.09 |
| 112 | 46.83 | 2.293 | 168 | E | 1.99 |
| 113 | 42.64 | 1.911 | 168 | E | 2.05 |
| 116 | 34.41 | 1.658 | 168 | G | 3.16 |
| 117 | 41.46 | 1.467 | 168 | G | 2.64 |
| 121 | 41.80 | 2.274 | 168 | G | 0.84 |
| 118 | 39.82 | 1.764 | 168 | N | 1.52 |
| 119 | 35.91 | 2.002 | 168 | N | 1.50 |
| 120 | 36.12 | 1.706 | 168 | N | 1.39 |

Jeder Wert wurde in Doppelbestimmungen ermittelt.

Versuchsbedingungen:

Testansatz: 1.4 ml Puffer (pH 6)  
0.1 ml Probe  
0.5 ml Maltose (300 mg/ml)

Temperatur 37°C, Inkubationszeit 60 min, Hitzedenaturierung 5 min.

|      |      |      |       |       |
|------|------|------|-------|-------|
| 1.89 | 2.82 |      | 0.079 |       |
|      | 2.63 | 3.09 | 0.072 | 0.082 |
|      | 3.84 |      | 0.097 |       |
| 2.27 | 3.62 |      | 0.091 |       |
|      | 5.05 | 4.33 | 0.116 | 0.104 |
| 2.58 | 5.20 |      | 0.145 |       |
|      | 5.63 | 5.41 | 0.121 | 0.133 |
| 1.75 | 3.06 |      | 0.071 |       |
|      | 4.92 | 3.72 | 0.125 | 0.093 |
|      | 3.18 |      | 0.084 |       |
| 2.02 | 4.56 |      | 0.097 |       |
|      | 3.92 | 4.24 | 0.091 | 0.094 |
| 2.21 | 5.24 |      | 0.152 |       |
|      | 3.87 | 3.67 | 0.093 | 0.096 |
|      | 1.91 |      | 0.045 |       |
| 1.47 | 2.68 |      | 0.067 |       |
|      | 3.0  | 2.68 | 0.083 | 0.072 |
|      | 2.37 |      | 0.065 |       |

Tabelle 9

Hauptversuch 3

|    | Maus (g) | Leber (g) | Zeitpunkt (h) | Enzym E<br>Ghost G<br>NaCl N | U/g Leber |
|----|----------|-----------|---------------|------------------------------|-----------|
| 1  | 37.23    | 1.904     | 2             | E                            | 2.88      |
| 2  | 36.20    | 1.510     | 2             | E                            | 1.57      |
| 3  | 36.03    | 1.811     | 2             | E                            | 3.19      |
| 4  | 36.16    | 1.343     | 2             | E                            | 2.38      |
| 5  | 36.69    | 1.745     | 2             | E                            | 1.97      |
| 6  | 36.77    | 1.721     | 2             | G                            | 1.9       |
| 7  | 36.15    | 1.666     | 2             | G                            | 2.5       |
| 8  | 35.37    | 1.793     | 2             | G                            | 1.94      |
| 9  | 38.47    | 1.572     | 2             | G                            | 2.0       |
| 10 | 38.07    | 1.805     | 2             | G                            | 2.23      |
| 11 | 32.40    | 1.210     | 2             | N                            | 1.96      |
| 12 | 36.29    | 1.877     | 2             | N                            | 1.64      |
| 13 | 35.43    | 1.819     | 2             | N                            | 2.88      |
| 14 | 34.85    | 1.686     | 2             | N                            | 1.24      |
| 15 | 34.08    | 1.722     | 2             | N                            | 1.77      |
| 16 | 37.53    | 2.018     | 24            | E                            | 1.94      |
| 17 | 39.74    | 1.852     | 24            | E                            | 1.31      |
| 18 | 37.36    | 1.619     | 24            | E                            | 2.11      |
| 19 | 35.37    | 2.076     | 24            | E                            | 2.46      |
| 20 | 36.01    | 2.009     | 24            | E                            | 2.06      |
| 21 | 36.22    | 1.717     | 24            | G                            | 1.62      |
| 22 | 36.85    | 2.014     | 24            | G                            | 1.87      |
| 23 | 36.98    | 1.885     | 24            | G                            | 1.86      |
| 24 | 40.31    | 2.374     | 24            | G                            | 1.66      |
| 25 | 33.50    | 1.375     | 24            | G                            | 1.79      |

| $\bar{U}/g$ Leber | U/Leber | $\bar{U}/Leber$ | U/g Maus | $\bar{U}/g$ Maus |
|-------------------|---------|-----------------|----------|------------------|
| 2.4               | 5.48    | 4.05            | 0.147    | 0.114            |
|                   | 2.37    |                 | 0.065    |                  |
|                   | 5.77    |                 | 0.160    |                  |
|                   | 3.19    |                 | 0.088    |                  |
|                   | 3.43    |                 | 0.110    |                  |
| 2.11              | 3.26    | 3.61            | 0.088    | 0.095            |
|                   | 4.16    |                 | 0.115    |                  |
|                   | 3.47    |                 | 0.098    |                  |
|                   | 3.14    |                 | 0.081    |                  |
|                   | 4.03    |                 | 0.094    |                  |
| 1.89              | 2.37    | 3.16            | 0.073    | 0.091            |
|                   | 3.07    |                 | 0.084    |                  |
|                   | 5.23    |                 | 0.147    |                  |
|                   | 2.09    |                 | 0.059    |                  |
|                   | 3.05    |                 | 0.092    |                  |
| 1.97              | 3.91    | 3.79            | 0.104    | 0.102            |
|                   | 2.42    |                 | 0.060    |                  |
|                   | 3.41    |                 | 0.091    |                  |
|                   | 5.10    |                 | 0.144    |                  |
|                   | 4.13    |                 | 0.114    |                  |
| 1.76              | 2.78    | 3.29            | 0.076    | 0.088            |
|                   | 3.76    |                 | 0.102    |                  |
|                   | 3.51    |                 | 0.095    |                  |
|                   | 3.94    |                 | 0.097    |                  |
|                   | 2.46    |                 | 0.073    |                  |

|    |       |       |    |   |      |
|----|-------|-------|----|---|------|
| 26 | 38.16 | 1.790 | 24 | N | 1.53 |
| 27 | 36.54 | 1.606 | 24 | N | 1.03 |
| 28 | 33.89 | 1.661 | 24 | N | 1.08 |
| 29 | 40.15 | 1.617 | 24 | N | 1.97 |
| 30 | 42.01 | 1.884 | 24 | N | 1.92 |
| 31 | 38.31 | 2.016 | 48 | E | 2.83 |
| 32 | 37.60 | 2.069 | 48 | E | 3.55 |
| 33 | 27.97 | 1.201 | 48 | E | 3.73 |
| 34 | 37.36 | 1.899 | 48 | E | 3.29 |
| 35 | 31.97 | 1.447 | 48 | E | 2.98 |
| 36 | 37.05 | 2.018 | 48 | G | 3.40 |
| 37 | 37.22 | 1.989 | 48 | G | 3.66 |
| 39 | 40.42 | 2.352 | 48 | G | 3.59 |
| 40 | 38.04 | 1.608 | 48 | G | 3.84 |
| 41 | 38.81 | 2.153 | 48 | G | 3.41 |
| 42 | 37.38 | 1.647 | 48 | N | 3.20 |
| 43 | 34.03 | 1.823 | 48 | N | 3.00 |
| 44 | 35.14 | 1.784 | 48 | N | 3.51 |
| 45 | 41.18 | 1.685 | 48 | N | 3.23 |
| 46 | 36.62 | 1.814 | 48 | N | 2.68 |
| 47 | 39.43 | 2.194 | 72 | E | 3.36 |
| 48 | 41.51 | 2.203 | 72 | E | 3.17 |
| 49 | 41.31 | 1.809 | 72 | E | 3.08 |
| 51 | 32.60 | 1.961 | 72 | E | 3.31 |
| 52 | 38.34 | 1.648 | 72 | G | 3.45 |
| 53 | 37.90 | 1.983 | 72 | G | 3.30 |
| 54 | 35.14 | 1.927 | 72 | G | 3.82 |
| 55 | 34.80 | 1.890 | 72 | G | 3.20 |

|      |      |      |       |       |
|------|------|------|-------|-------|
|      | 2.73 |      | 0.071 |       |
|      | 1.65 |      | 0.045 |       |
| 1.50 | 1.79 | 2.59 | 0.052 | 0.066 |
|      | 3.18 |      | 0.079 |       |
|      | 3.61 |      | 0.085 |       |
|      | 5.70 |      | 0.148 |       |
|      | 7.34 |      | 0.195 |       |
| 3.38 | 4.47 | 5.61 | 0.159 | 0.160 |
|      | 6.24 |      | 0.167 |       |
|      | 4.31 |      | 0.134 |       |
|      | 6.86 |      | 0.185 |       |
|      | 7.27 |      | 0.195 |       |
| 3.62 | 8.44 | 7.21 | 0.208 | 0.187 |
|      | 6.17 |      | 0.162 |       |
|      | 7.34 |      | 0.185 |       |
|      | 5.27 |      | 0.140 |       |
|      | 5.46 |      | 0.160 |       |
| 3.12 | 6.26 | 5.45 | 0.178 | 0.148 |
|      | 5.44 |      | 0.132 |       |
|      | 4.86 |      | 0.132 |       |
|      | 7.37 |      | 0.187 |       |
|      | 6.98 |      | 0.168 |       |
| 3.23 | 5.57 | 6.60 | 0.135 | 0.173 |
|      | 6.49 |      | 0.202 |       |
|      | 5.68 |      | 0.148 |       |
|      | 6.54 |      | 0.172 |       |
| 3.44 | 7.36 | 6.40 | 0.209 | 0.176 |
|      | 6.05 |      | 0.177 |       |

|    |       |       |     |   |      |
|----|-------|-------|-----|---|------|
| 57 | 42.16 | 2.407 | 72  | N | 2.19 |
| 58 | 42.96 | 1.795 | 72  | N | 3.45 |
| 60 | 36.95 | 1.693 | 72  | N | 3.49 |
| 61 | 38.32 | 2.609 | 72  | N | 3.10 |
| 62 | 32.43 | 1.727 | 144 | E | 2.94 |
| 63 | 38.77 | 1.897 | 144 | E | 3.77 |
| 64 | 40.05 | 1.545 | 144 | E | 2.82 |
| 65 | 39.78 | 1.706 | 144 | E | 3.54 |
| 66 | 43.3  | 2.160 | 144 | E | 2.98 |
| 67 | 40.13 | 2.255 | 144 | G | 3.12 |
| 68 | 38.57 | 2.139 | 144 | G | 2.83 |
| 70 | 39.84 | 2.016 | 144 | G | 3.57 |
| 71 | 41.92 | 1.942 | 144 | G | 4.16 |
| 72 | 43.28 | 2.214 | 144 | N | 3.21 |
| 74 | 39.52 | 2.097 | 144 | N | 3.34 |
| 75 | 37.40 | 2.064 | 144 | N | 2.58 |
| 76 | 38.71 | 1.964 | 144 | N | 3.48 |
| 77 | 37.78 | 1.976 | 144 | N | 2.90 |

Jeder Wert wurde in Doppelbestimmungen ermittelt.

Versuchsbedingungen:

Testansatz: 1.4 ml Puffer (pH 6)  
0.1 ml Probe  
0.5 ml Maltose (300 mg/ml)

Temperatur 37°C, Inkubationszeit 60 min, Hitzedenaturierung 5 min.

|      |      |      |       |       |
|------|------|------|-------|-------|
|      | 5.27 |      | 0.125 |       |
|      | 6.19 |      | 0.144 |       |
| 3.05 | 5.9  | 6.36 | 0.159 | 0.148 |
|      | 8.08 |      | 0.165 |       |
|      | 5.07 |      | 0.156 |       |
|      | 7.15 |      | 0.184 |       |
| 3.21 | 4.35 | 5.81 | 0.108 | 0.149 |
|      | 6.04 |      | 0.151 |       |
|      | 6.43 |      | 0.148 |       |
|      | 7.04 |      | 0.175 |       |
|      | 6.05 |      | 0.156 |       |
| 3.42 | 7.19 | 6.84 | 0.180 | 0.168 |
|      | 7.11 |      | 0.163 |       |
|      | 6.81 |      | 0.157 |       |
|      | 7.0  |      | 0.177 |       |
| 3.10 | 5.32 | 6.33 | 0.142 | 0.160 |
|      | 6.83 |      | 0.176 |       |
|      | 5.73 |      | 0.151 |       |

Die Tabellen 10-12 geben die Mittelwerte der Hauptversuche 1-3 wieder.

Tabelle 10

Hauptversuch 1

| Anzahl<br>Mäuse | Zeit-<br>punkt<br>(h) |   | $\bar{U}/g$<br>Leber | E-N<br>bzw.<br>G-N | $\bar{U}/\text{Leber}$ | E-N<br>bzw.<br>G-N | $\bar{U}/g$ Maus | E-N<br>bzw.<br>G-N |
|-----------------|-----------------------|---|----------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------|--------------------|
| 6               | 2                     | E | 2.44                 | 0.83               | 4.54                   | 2.11               | 0.129            | 0.051              |
| 6               | 2                     | G | 2.34                 | 0.73               | 3.95                   | 1.52               | 0.116            | 0.038              |
| 4               | 2                     | N | 1.61                 |                    | 2.43                   |                    | 0.078            |                    |
| 3               | 24                    | E | 1.85                 | 0.65               | 3.91                   | 1.95               | 0.110            | 0.054              |
| 3               | 24                    | G | 2.12                 | 0.92               | 3.84                   | 1.88               | 0.113            | 0.057              |
| 2               | 24                    | N | 1.20                 |                    | 1.96                   |                    | 0.056            |                    |
| 3               | 48                    | E | 1.32                 | 0.24               | 2.38                   | 0.68               | 0.065            | 0.009              |
| 3               | 48                    | G | 1.57                 | 0.49               | 3.01                   | 1.31               | 0.087            | 0.031              |
| 2               | 48                    | N | 1.08                 |                    | 1.70                   |                    | 0.056            |                    |
| 3               | 144                   | E | 1.96                 | 0.13               | 3.23                   | 0.66               | 0.090            | 0.003              |
| 3               | 144                   | G | 2.08                 | 0.25               | 3.16                   | 0.59               | 0.092            | 0.005              |
| 1               | 144                   | N | 1.83                 |                    | 2.57                   |                    | 0.087            |                    |

Der 2-Stundenwert wurde aus den 1 und 3 Stundenwerten unter Annahme eines linearen Verlaufs gemittelt.

Tabelle 11

Hauptversuch 2

| Anzahl<br>Mäuse | Zeit-<br>punkt<br>(h) |   | $\bar{U}/g$<br>Leber | E-N<br>bzw.<br>G-N | $\bar{U}/\text{Leber}$ | E-N<br>bzw.<br>G-N | $\bar{U}/g$ Maus | E-N<br>bzw.<br>G-N |
|-----------------|-----------------------|---|----------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------|--------------------|
| 5               | 2                     | E | 3.14                 | 0.99               | 5.56                   | 1.78               | 0.147            | 0.053              |
| 6               | 2                     | G | 2.79                 | 0.64               | 5.26                   | 1.48               | 0.133            | 0.039              |
| 5               | 2                     | N | 2.15                 |                    | 3.78                   |                    | 0.094            |                    |
| 2               | 24                    | E | 2.56                 | 0.67               | 5.58                   | 2.49               | 0.128            | 0.046              |
| 3               | 24                    | G | 2.61                 | 0.72               | 4.55                   | 1.49               | 0.114            | 0.032              |
| 3               | 24                    | N | 1.89                 |                    | 3.09                   |                    | 0.082            |                    |
| 2               | 48                    | E | 2.27                 | 0.52               | 4.33                   | 0.6                | 0.104            | 0.011              |
| 2               | 48                    | G | 2.58                 | 0.83               | 5.41                   | 1.69               | 0.133            | 0.040              |
| 3               | 48                    | N | 1.75                 |                    | 3.72                   |                    | 0.093            |                    |
| 2               | 168                   | E | 2.02                 | 0.55               | 4.24                   | 1.56               | 0.094            | 0.022              |
| 3               | 168                   | G | 2.21                 | 0.74               | 3.67                   | 0.99               | 0.096            | 0.024              |
| 3               | 168                   | N | 1.47                 |                    | 2.68                   |                    | 0.072            |                    |

Der 2-Stundenwert wurde aus den 1 und 3 Stundenwerten unter Annahme eines linearen Verlaufs gemittelt.

Tabelle 12

Hauptversuch 3

| Anzahl<br>Mäuse | Zeit-<br>punkt<br>(h) |   | $\bar{U}/g$<br>Leber | E-N<br>bzw.<br>G-N | $\bar{U}/\text{Leber}$ | E-N<br>bzw.<br>G-N | $\bar{U}/g$ Maus | E-N<br>bzw.<br>G-N |
|-----------------|-----------------------|---|----------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------|--------------------|
| 5               | 2                     | E | 2.4                  | 0.51               | 4.05                   | 0.89               | 0.114            | 0.023              |
| 5               | 2                     | G | 2.11                 | 0.22               | 3.61                   | 0.45               | 0.095            | 0.004              |
| 5               | 2                     | N | 1.89                 |                    | 3.16                   |                    | 0.091            |                    |
| 5               | 24                    | E | 1.97                 | 0.47               | 3.79                   | 1.20               | 0.102            | 0.036              |
| 5               | 24                    | G | 1.76                 | 0.26               | 3.29                   | 0.70               | 0.088            | 0.022              |
| 5               | 24                    | N | 1.50                 |                    | 2.59                   |                    | 0.066            |                    |
| 5               | 48                    | E | 3.38                 | 0.26               | 5.61                   | 0.16               | 0.160            | 0.012              |
| 5               | 48                    | G | 3.62                 | 0.50               | 7.21                   | 1.76               | 0.187            | 0.039              |
| 5               | 48                    | N | 3.12                 |                    | 5.45                   |                    | 0.148            |                    |
| 4               | 72                    | E | 3.23                 | 0.18               | 6.60                   | 0.24               | 0.173            | 0.025              |
| 4               | 72                    | G | 3.44                 | 0.39               | 6.40                   | 0.04               | 0.176            | 0.028              |
| 4               | 72                    | N | 3.05                 |                    | 6.36                   |                    | 0.148            |                    |
| 5               | 144                   | E | 3.21                 | 0.11               | 5.81                   | 0                  | 0.149            | 0                  |
| 4               | 144                   | G | 3.42                 | 0.32               | 6.84                   | 0.51               | 0.168            | 0.008              |
| 5               | 144                   | N | 3.10                 |                    | 6.33                   |                    | 0.160            |                    |



Tabelle 13

Temperatur, Luftdruck und relative Feuchtigkeit an den Meßtagen

| Datum   | Temperaturextreme |        |       | Luftdruck in mbar auf 0°C und<br>Normalschwere reduziert |       |       |       |
|---------|-------------------|--------|-------|----------------------------------------------------------|-------|-------|-------|
|         | max °C            | min °C | Diff. | I                                                        | II    | III   | Tm    |
| 14.5.82 | 21.1              | 3.4    | 17.7  | 963.9                                                    | 961.8 | 960.0 | 961.9 |
| 15.5.   | 23.3              | 5.7    | 17.6  | 959.0                                                    | 956.7 | 955.4 | 957.0 |
| 16.5.   | 24.6              | 6.6    | 18.0  | 955.5                                                    | 954.4 | 954.0 | 954.7 |
| 17.5.   | 21.9              | 8.9    | 13.0  | 955.6                                                    | 955.4 | 955.8 | 955.6 |
| 18.5.   | 24.8              | 8.9    | 15.9  | 955.4                                                    | 954.0 | 956.3 | 955.2 |
| 19.5.   | 20.6              | 12.2   | 8.4   | 958.2                                                    | 959.0 | 960.2 | 959.1 |
| 20.5.   | 22.6              | 8.4    | 14.2  | 959.6                                                    | 958.8 | 959.1 | 959.2 |
| 21.5.   | 18.7              | 11.2   | 7.5   | 961.6                                                    | 961.2 | 961.0 | 961.3 |
| 27.6.   | 17.7              | 11.4   | 6.3   | 951.5                                                    | 951.2 | 953.6 | 952.1 |
| 28.6.   | 20.2              | 11.4   | 8.8   | 954.7                                                    | 953.5 | 952.8 | 953.7 |
| 29.6.   | 18.3              | 11.9   | 6.4   | 954.7                                                    | 955.5 | 957.5 | 955.9 |
| 30.6.   | 19.1              | 10.3   | 8.8   | 960.8                                                    | 961.0 | 962.4 | 961.4 |
| 1.7.    | 20.6              | 11.2   | 9.4   | 963.5                                                    | 961.8 | 960.3 | 961.9 |
| 2.7.    | 25.5              | 10.8   | 14.7  | 957.8                                                    | 954.4 | 951.9 | 954.7 |
| 3.7.    | 28.9              | 15.4   | 13.5  | 951.5                                                    | 950.7 | 952.3 | 951.5 |
| 4.7.    | 20.3              | 11.8   | 8.5   | 956.8                                                    | 960.2 | 960.0 | 959.0 |
| 5.7.    | 22.7              | 9.1    | 13.6  | 961.1                                                    | 960.0 | 959.4 | 960.2 |
| 9.8.    | 23.1              | 14.8   | 8.3   | 958.6                                                    | 958.6 | 959.4 | 958.9 |
| 10.8.   | 21.9              | 14.3   | 7.6   | 960.1                                                    | 960.4 | 961.6 | 960.6 |
| 11.8.   | 24.8              | 13.8   | 11.0  | 962.0                                                    | 961.0 | 960.5 | 961.2 |
| 12.8.   | 30.3              | 12.7   | 17.6  | 951.6                                                    | 955.8 | 955.3 | 956.5 |
| 13.8.   | 26.5              | 15.8   | 10.7  | 955.2                                                    | 955.7 | 952.2 | 954.4 |
| 14.8.   | 21.5              | 15.2   | 6.2   | 955.7                                                    | 957.2 | 957.7 | 956.9 |
| 15.8.   | 28.0              | 10.6   | 17.4  | 956.0                                                    | 954.5 | 956.9 | 955.8 |
| 16.8.   | 24.1              | 14.7   | 9.4   | 957.2                                                    | 955.8 | 954.2 | 955.7 |

rel. Feuchtigkeit %

| I  | II | III | Tm   |
|----|----|-----|------|
| 65 | 28 | 56  | 49   |
| 59 | 30 | 66  | 51   |
| 67 | 26 | 51  | 48   |
| 62 | 43 | 77  | 61   |
| 70 | 36 | 91  | 66   |
| 87 | 55 | 82  | 75   |
| 84 | 51 | 91  | 75   |
| 88 | 88 | 95  | 90   |
| 96 | 69 | 87  | 84   |
| 78 | 50 | 74  | 67   |
| 84 | 74 | 74  | 78   |
| 71 | 47 | 56  | 58   |
| 62 | 42 | 74  | 59   |
| 74 | 43 | 81  | 66   |
| 53 | 44 | 73  | 57   |
| 90 | 83 | 77  | 83   |
| 71 | 36 | 71  | 59   |
| 39 | 54 | 91  | 61.3 |
| 93 | 75 | 87  | 85   |
| 86 | 53 | 88  | 75.6 |
| 89 | 42 | 73  | 68   |
| 66 | 75 | 76  | 72   |
| 93 | 58 | 87  | 79   |
| 91 | 48 | 92  | 77   |
| 94 | 64 | 94  | 84   |

I gemessen um 8h

II gemessen um 15h

III gemessen um 22h

Höchste und niedrigste Werte des Monats:

Luftdruck mbar am 1.7.82: 963.5 (max)

rel. Feuchtigkeit % am 16.5.82: 26 (min)

Deutscher Wetterdienst, Station München Riem, Flugwetterwarte;  
Seehöhe 527m.

Versuch 1: 15.5.82 - 20.5.82

Versuch 2: 29.6.82 - 6.7.82

Versuch 3: 10.8.82 - 15.8.82

## 6. Literaturverzeichnis

1. Austin, J.H.: Studies in metachromatic Leucodystrophy ,  
XI. Therapeutic considerations, 1972.  
Birth Defects: Original Article Series, Vol. 9, Nr. 2,  
125-129, 1973
2. Barmann, Th.E.: Enzyme handbook.  
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York  
Vol. II, 576-579, 1969
3. Baudhuin, P., Hers, H.G., Loeb, M.D.: An electron micro-  
scopic and biochemical study of type II glycogenosis.  
Lab. Invest. 13: 1139-1152, 1964
4. Beaufay, H., Bendall, D.S.: Tissue fractionation studies.  
Biochem. J., 73: 628, 1959
5. Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse.  
Bd 1 und 2, Verlag Chemie Weinheim/ Bergstraße, 1974
6. Brady, R.O. et al.: Prospects for enzyme replacement  
therapy in heritable metabolic disorders.  
aus: Cockburn, F., Gitzelmann, R.: Inborn errors of  
metabolism in humans  
MTP Press limited, 1982
7. Brady, R.O., Pentchev, P.G., Gal, A.E.: Investigations in  
enzyme replacement therapy in lipid storage diseases.  
Fed. Proc. 34: 1310-1315, 1975
8. Broadhead, D.M., Butterworth, J.:  $\alpha$ - Glucosidase in  
Pompe's Disease.  
J. Inher. Metab. Dis. 1: 153-154, 1978

9. Brown, B.I., Brown, D.H.: The subcellular distribution of enzymes in type II glycogenosis and the occurrence of an oligo  $\alpha$ -1-4- glucan glucan hydrolase in human tissues.  
Biochim., Biophys. Acta 110: 124, 1965
10. Bulfield G.: Nutrition and animal models of inherited metabolic disease.  
Proc. Nutr. Soc. 36: 61, 1977
11. Bulfield, G.: Inherited metabolic disease in laboratory animals: A review.  
L. Inher. Metab. Dis. 3: 133-143, 1980
12. Chambers, J.P., Williams, J.C.: Acid  $\alpha$ - Glucosidase from Human Heart.  
Enzyme 29: 109-119, 1983
13. Chang, T.M.S.: Artificial cell-encapsulated enzymes and adsorbents in congenital metabolic disorders.  
aus: Cockburn, F., Gitzelmann, R.: Inborn errors of metabolism in humans.  
MTP Press limited, 1982
14. Chang, T.M.S.: Biomedical applications of immobilized enzymes and proteins.  
Vol. I, Plenum Press New York and London, 1977
15. Dahlquist, A.: Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent.  
Biochem. J. 80: 547, 1961
16. De Barsey, T.: Discussion in: Enzyme therapy in lysosomal storage diseases.  
Eds. Tager. Hooghwinkel and Deams, p.181, North Holland Amsterdam, 1974

17. De Barsy, T., Jacquemin, P., Devos, P., Hers, H.G.:  
Rodent and human acid  $\alpha$ -glucosidase, purification,  
properties and inhibition by antibodies. Investigation in  
type II glycogenosis.  
Eur. J. Biochem. 31, 156-165, 1975
  
18. De Barsy, T., Jacquemin, P., Van Hoof, F., Hers, H.G.:  
Enzyme replacement in Pompe's disease: An attempt with  
purified human acid  $\alpha$ -glucosidase .  
Birth Defects, Original Article Series, Vol. 9(2): 184-  
190, 1973
  
19. De Duve, C.: From cytochromes to lysosomes.  
Fed. Proc. 23: 1045-1049, 1964
  
20. De Duve, C., Beaufay, H. et al.: Intracellular localisa-  
tion of catalase and of some oxidases in rat liver.  
Biochim. Biophys. Acta 40, 186-187, 1960
  
21. De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R.,  
Appelmans, F.: Tissue fractionation studies.  
Biochem. J. 60: 604, 1955
  
22. Deloach, J., Ihler, G.: A dialysis procedure for loading  
erythrocytes with enzymes and lipids.  
Biochim. Biophys. Acta 496 (1): 136-145, 24.1.1977
  
23. Dohm, G.L., Tapscott, E.B., Garriss, D.R.: The influence  
of glycogen level on hepatic glucose reflux in the anes-  
thetized rat.  
Biochem. Med., 30/2: 157-162, 1983
  
24. Dooley, K.C., Applegarth, D.A.: Uptake of lysosomal  
enzymes by human fibroblasts.  
J. Inher. Metab. Dis. 3: 145-147, 1980

25. Engel, A.G., Gomez, M.R., Seybold, M.E., Lambert, E.H.:  
The spectrum and diagnosis of acid maltase deficiency.  
Neurology, 23: 95-106, 1973
26. Garancis, J.C.: Type II Glycogenosis.  
Am. J. Med. 44 (2): 289-300, 1968
27. Geddes, R., Otter, D.E., Scott, G.K., Taylor, J.A.: Dis-  
turbance of lysosomal glycogen metabolism by liposomal  
anti  $\alpha$ - glucosidase and some anti-inflammatory drugs.  
Biochem. J., 212/1: 99-109, 1983
28. Grabowski, G.A., Desnick, R.J.: Enzyme replacement in  
genetic diseases.  
aus: Holcenberg, J., Roberts, J.: Enzymes as drugs.  
John Wiley and sons, 1981
29. Griffin, J.L.: Infantile acid maltase deficiency.  
Virchow Arch. (Cell Pathol.) 45: 23-26, 1984
30. Gross, R. Schölmerich, P.: Lehrbuch der Inneren Medizin.  
Schattauer Verlag, Stuttgart, 6. Auflage, 1982
31. Harper, H.A., Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L.:  
Physiologische Chemie.  
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1975
32. Henning, R., Kaulen, H.D., Stoffel, W.: Isolation and  
chemical composition of the lysosomal and the plasma  
membrane of the rat liver cell.  
Huppe Seyler's, Z. Physiol. Chemie, Bd. 351: 1191-1199,  
Okt. 1979
33. Hers, H.G., Van Hoof, F.: Lysosomes and storage diseases.  
Academic Press Inc., New York, 1975

34. Hers, H.G., Van Hoof, F.: Glycogen - storage diseases: Type II and type VI glycogenosis in carbohydrate metabolism and its disorders.  
aus: Dickens, F., Randle, P.J., Whelan, W.J.  
Academic New York, Vol. II: 151, 1968
35. Hers, H.G.:  $\alpha$ - Glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease .  
Biochem. J., 86: 11-16, 1963
36. Hommes, F.A. (ed.): Models for the study of inborn errors of metabolism.  
North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1979
37. Hug, G. et al.: Rapid prenatal diagnosis of glycogen storage disease type II by electron microscopy of uncultured amniotic fluid cells.  
The New England Journal of Medicine, Vol. 310, 1018-1022, 1984
38. Hug, G.: Pre- and postnatal pathology, enzyme treatment and unresolved issues in five lysosomal disorders.  
Pharm. Rev. 30: 565, 1978
39. Hug, G.: Enzyme therapy and prenatal diagnosis in glycogenosis type II.  
Am. J. Dis. Child, Vol. 128, Nov. 1974
40. Hug, G., Schubert, W.K.: Hepatic lysosomes in Pompe's disease: Disappearance during glucosidase administration.  
J. Clin. Invest. 46: 1073, 1967a
41. Hug, G., Schubert, W.K.: Lysosomes in Type II glycogenosis (*Aspergillus niger*).  
J. Cell Biol. 35: C1-C6, 1976b

42. Hug, G., Schubert, W.K., Chuck, G.: Type II glycogenosis: Treatment with extrakt of aspergillus niger.  
National meeting abstracts 345, Clin. Res. 16, 345, 1968
43. Huijing, F., Wattuck, B.L., Whelau, W.J.: - Glucosidase administration: Experiences in two patients with glycogen storage disease compared with animal experiences.  
Birth Defects, Original Article Series, Vol.9: 91, 1973
44. Huijing, F., Van Creveld, S., Losekoof, G.: Diagnosis of generalized glycogen storage disease (Pompe's disease).  
J. Pediatr., 63 (5): 984-997, 1963
45. Humphreys, J.D., Ihler, G.: Enhanced stability of erythrocyte-entrapped glucocerebrosidase activity  
J. Lab. Clin. Med. 96 (4): 682-692, Oct. 1980
46. Ihler, G.M., Glew, R.H., Schnurre, F.W.: Enzyme loading of erythrocytes.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 70: 2663, 1973
47. Ihler, G.M., Lantzy, A., Purpura, J., Glew, R.H.  
J. Clin. Invest. 56: 595-602, 1975
48. Iwamasa, T. et al.: Immunohistochemical demonstration of acid  $\alpha$ - glucosidase in fetal rat hepatocytes and glycogenosomes of newborn rat hepatocytes.  
Path. Res. Pract. 174, 392-402, 1982
49. Koster, J.F., Slee, R.G., Hulsman, W.C.: The use of leucocytes as an acid in the diagnosis of a variant of glycogen storage disease type II glycogenosis (Pompe's disease).  
Eur. J. Clin. Invest. 2: 467-471, 1972

50. Lauer, R.M., Mascarinas, J., Racela, A.S., Diehl, A.M., Brown, B.J.: Administration of a mixture of fungal glucosidases to a patient with type II glycogenosis (Pompe's disease)
51. Lehninger, A.L.: Biochemie .  
Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1977
52. Lejeune, N., Thines-Sempoux, D., Hers, H.G.: Tissue fractionation studies.  
Biochem. J. 86: 16-21, 1963
53. Lullmann-Rauch, R.: Lysosomal glycogen storage mimicking the cytological picture of Pompe's disease as induced in rats by injection of an  $\alpha$ - glucosidase inhibitor.  
Cell Pathol. 39/2: 187-202, 1982
54. Lynch, W.E., Sartiano, G.P., Ghaffar, A.: Erythrocytes as carriers of chemotherapeutic agents for targeting the reticuloendothelial system.  
American Journal of Hematology 9: 249-259, 1980
55. Matsuishi, T. et al.: Childhood acid maltase deficiency.  
Arch. Neurol., Vol. 41, 1984
56. Matsuoka, Y. et al.: Adult onset acid maltase deficiency.  
Clin. Neurol., 21/9:796-803, 1981
57. Nemeth, S.: Inhibitory effect of fasting on the activation of liver glycogen phosphorylase of rats by Arginine-Vasopressin.  
Exp. Clin. Endocrinol., Vol. 82,1: 104-106, 1982
58. Neufeld, E.F.: Recent studies on the maturation of lysosomal enzymes.  
aus: Cockburn, F., Gitzelmann, R.: Inborn errors of metabolism in humans.  
MTP Press limited, 1982

59. Nitowski, H.M., Grunfeld, A.: Lysosomal  $\alpha$ - Glucosidase in type II glycogenosis.  
J. Lab. Clin. Med. 69 (3): 472-484, 1967
  
60. Pentchev, P.G., Gal, A.E. et al.: A lysosomal storage disorder in mice characterized by a dual deficiency of sphingomyelase and glucocerebrosidase.  
Biochim. Biophys. Acta 619 (3): 669-679, 1980
  
61. Pongratz, D., Hübner, G., Deutel, Th., Wieland, O.H.: Zur Kenntniss mitigierter adulter Formen des Mangels an saurer Maltase (Morbus Pompe).  
Klin. Wochenschrift 61: 743-750, 1983
  
62. Poznanski, M.J., Singh, R.:  $\alpha$ - 1-4 Glucosidase - albumin polymers: Advantages for enzyme replacement therapy.  
aus: Crawford, M., Gibbs, D.A., Watts, R.W.E.: Inborn errors of metabolism.  
eds., 161-171, 1982
  
63. Poznanski, M.J., Singh, R., Singh, B.: Insulin : Carrier Potential for Enzyme and Drug Therapy.  
Science, Vol. 223, 1984
  
64. Poznanski, M.J., Bhardwaj, D.: Antibody-mediated targeting of  $\alpha$ - 1-4 glucosidase-albumin polymers to rat hepatocytes.  
Biochem. J. 106: 89-93, 1981
  
65. Roerdink, F.H., Van Renswoude, A.J.B.M., Wielinga, B.Y., Kroon, A.M., Sherphof, G.L.: Entrapment within liposomes facilitates uptake of amyloglucosidase by cultured fibroblasts from a patient with Pompe's disease. (glycogenosis Type II).  
J. Molec. Med. 1: 257, 1976

66. Salawski, I.S., Nadler, H.L.: A fluorometric assay of  $\alpha$ -glucosidase and its application in the study of Pompe's disease.  
J. Lab. Clin. Med. 81: 450, 1973
67. Salafski, I.S., Nadler, H.L.:  $\alpha$ -1-4 Glucosidase activity in Pompe's disease.  
J. Pediatr. 79: 794-798, 1974
68. Shin-Bühning, J.S. et al: The characteristics of acid  $\alpha$ -1-4 glucosidase in various human adult and fetal tissues.  
J. Inher. Metab. Dis. 1: 159-160, 1978
69. Slonim, A.E., Coleman, R.A., Mc Elligot, M.A. et al. : Improvement of muscle function in acid maltase deficiency by high protein therapy.  
Neurology 33/1: 34-38, 1982
70. Smith, H.L., Amick, L.D., Sidbury, J.B.: Type II glycogenosis .  
Am. J. Dis. Child, 111: 475-481, 1966
71. Sprandel, U., Clark, J.B., Chalmers, R.A.: Hubbard, A.R.: Morphology of haemoglobin-containing human erythrocyte ghosts .  
Micron 12: 29-36, 1981d
72. Sprandel, U., Hubbard, A.R., Chalmers, R.A.: Towards enzyme therapy using carrier erythrocytes.  
J. Inher. Metab. Dis. 4: 99-100, 1981
73. Sprandel, U., Schrot, W., Zöllner, N.: Targeting "carrier erythrocytes" to the liver, an approach to enzyme replacement therapy.  
In Press, 1981e

74. Sprandel, U., Stark, F., Zöllner, N.: In vitro studies towards enzyme replacement therapy using carrier erythrocytes.  
In Press, 1981f
75. Sprandel, U., Hubbard, A.R., Chalmers, R.A.: In vivo Überlebenszeit von Erythrozytenschatten als Trägersysteme für Pharmaka.  
Verh. Dt. Ges. Inn. Med. 87: 1172-1174, 1981a
76. Sprandel, U., Chalmers, R.A.: Morphologie von Erythrozytenschatten als in vivo Trägersysteme.  
Verh. Dt. Ges. Inn. Med. 86: 1090-1092, 1980
77. Sprandel, U., Hubbard, A.R., Chalmers, R.A.: In vivo life-span of resealed rabbit erythrocytes.  
Res. Exp. Med. (Berlin) 177: 13-17, 1980
78. Sprandel, U., Hubbard, A.R., Chalmers, R.A.: Species-specific characteristics of resealed erythrocyte ghosts in vitro.  
Biochem. Soc. Trans. 8: 536-537, 1980b
79. Sprandel, U., Hubbard, A.R., Chalmers, R.A.: Survival of "carrier erythrocytes" in dogs.  
Clin. Sci. 59: 7-8, 1980c
80. Sprandel, U., Hubbard, R.A., Chalmers, R.A.: Towards enzyme therapy using carrier erythrocytes.  
Clin. Res. Centre Rep., Med. Res. Council London, 147-150, 1980
81. Sprandel, U., Hubbard, A.R., Chalmers, R.A.: Membrane transport resealed haemoglobin - containing human erythrocyte "ghost" prepared by a dialysis procedure.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 91: 79-85, 1979c

82. Sprandel, U., Hubbard, A.R., Chalmers, R.A.: Transport of uric acid and L-phenylalanine by resealed erythrocyte ghost prepared by a dialysis technique.  
Biochem. Soc. Trans. 7: 958, 1979
83. Stanbury, J.B., Wyngarden, J.B., Fredrickson, D.S.: The metabolic basis of inherited disease.  
Mc Graw Hill, New York: 2-32, 1978
84. Steckel, F. et al: Biosynthesis of acid  $\alpha$ -glucosidase in late-onset forms of glycogenosis type II (Pompe's disease).  
Feb.'s Letters, Vol. 150, 1, 1982
85. Tager, J.M. et al.: An appraisal of human trials in enzyme replacement therapy of genetic diseases.  
Birth Defects, Orig. Art. Ser. XVI: 343-359, 1980
86. Tyrrell, D.A., Ryman, B.E., Keeton, B.R., Dubowitz, K.V.: Use of liposomes in treating type II glycogenosis.  
Br. Med. J. 2: 88, 1976a
87. Ugalde, R.A., Staneloni, R.J., Leloir, L.F.: Microsomal glucosidases of rat liver, partial purification and inhibition by dissacharides.  
Eur. J. Biochem. 113 (1): 97-103, 1980
88. Walvoort, H.C.: Glycogen storage diseases in animals and their potential value as models of human disease.  
J. Inher. Metab. Dis. 6/1: 3-16, 1983
89. Wattiaux, R., De Duve, C.: Tissue fractionation studies.  
Biochem. J., Vol. 63: 606 ff., 1956
90. Weichselbaum, T.E., Sanogyi, M.: A method for the determination of small amounts of ketone bodies.  
J. Biol. Chem., 140: 5, 1941

91. Williams, J.C. et al.: Enzyme replacement in Pompe's disease with an  $\alpha$ - glucosidase low density lipoprotein.  
Birth Defects 16 (1): 415-423, 1980
92. Williams, H.E.:  $\alpha$ - Glucosidase activity in human leucocytes.  
Biochim. Biophys. Acta, 124: 34-38, 1966
93. Wisher, H.M., Evans, H.W.: Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane.  
Biochem. J. 146: 375-388, 1975
94. Zimmermann, U., Riemann, F., Pilwat, G.: Enzyme loading of electrically homogenous human red blood cell ghosts prepared by dielectric breakdown.  
Biochim. Biophys. Acta 436: 460-474, 1976
95. Zimmermann, U.: Organspezifische Applikation von Pharmaka über zelluläre Trägersysteme.  
Chemie für Labor und Betrieb, 28: 505- 507, 1977.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. N. Zöllner. Herr P.D. Dr. U. Sprandel unterstützte mich bei der experimentellen Ausarbeitung durch wertvolle Ratschläge und unterzog das Manuskript einer kritischen Durchsicht. Bei der Versuchsdurchführung kam mir die praktische Erfahrung von Frau Brigitte de Buhr-Holzmann zugute, bei der graphischen Ergebnisdarstellung erhielt ich apparative Unterstützung von Herrn Dipl. Ing. Rainer Baumgart.

Allen genannten Personen sei herzlich gedankt.

LEBENS LAUF

Name: Claudia Thannheimer

Geburtsdatum/-ort: 6.9.1956 / Lohr am Main

Eltern: Dr. med. Hermann Thannheimer, praktischer Arzt  
Dr. med. Gertraud Thannheimer, praktische Ärztin

Konfession: römisch-katholisch

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1962-1975 Allgemeine Hochschulreife am neu-  
sprachlichen Gymnasium der Schwestern  
vom hl. Kreuz, Gemünden

Hochschulbildung: 1975-1977 Studium der Ernährungswissenschaften  
an der Justus-Liebig-Universität,  
Giessen  
1977-1984 Studium der Humanmedizin an der  
Ludwig-Maximilians-Universität,  
München  
Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeit: seit 1985 Assistenzarzt in der anästhesiolo-  
gischen Abteilung des Behandlungs-  
zentrums Vogtareuth,  
Chefarzt Prof. Dr. J. Riemer.







